



Biodégradation des herbicides en sols tempérés - Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol

Cécile Monard

► To cite this version:

Cécile Monard. Biodégradation des herbicides en sols tempérés - Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Rennes 1, 2008. Français. NNT: . tel-00350389

HAL Id: tel-00350389

<https://theses.hal.science/tel-00350389>

Submitted on 6 Jan 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° ordre : 3725

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

Mention Biologie

PAR

Cécile MONARD

Equipe Rôle de la Biodiversité dans les Processus Écologiques
CNRS UMR 6553 EcoBio, IFR CAREN Rennes
Université de Rennes 1
Ecole Doctorale Vie-Agro-Santé
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

<p>Biodégradation des herbicides en sols tempérés – Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol</p>

Soutenue le 30 Avril 2008 devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs	Pierre PEYRET	CNRS/Université Clermont Ferrand II
	Jean-Charles MUNCH	Université Technique de Munich
Examineurs	Philippe NORMAND	CNRS/Université Lyon 1
Invité	Fabrice MARTIN-LAURENT	INRA/Université de Bourgogne
Directeur de thèse	Françoise BINET	CNRS/Université Rennes 1
Co-directeur	Philippe VANDENKOORNHUYSE	CNRS/Université Rennes 1

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger ce manuscrit et particulièrement Messieurs Jean Charles Munch et Pierre Peyret pour avoir accepté d'être rapporteurs.

Je remercie Françoise Binet pour son encadrement tout au long de ces trois années et quelques mois, pour son implication dans ce projet et dans le montage de mes projets futurs et surtout pour m'avoir fait découvrir l'écologie et le monde des vers de terre : Je n'avais jamais imaginé à quel point ils compteraient un jour dans ma vie !!

Merci à Philippe Vandenkoornhuysen pour son précieux soutien pendant ce travail, sa philosophie scientifique, son optimisme à toutes épreuves et sa présence porte bonheur lors de la récupération des fractions du SIP !!

Je remercie la région Bretagne pour l'attribution de ma bourse de recherche sans laquelle rien n'aurait été possible.

Sur un plan scientifique je remercie toute l'équipe IBTM (nouvellement RBPE) pour m'avoir accueillie et soutenue et particulièrement Nathalie Josselin et Marie-Paule Briand pour les coups de main fournis et pour m'avoir suivie dans des manip radioactives intenses. Je remercie également Elodie pour son stage de M1 qui m'a fait gagner un temps précieux. Merci également à l'équipe MGS de l'INRA de Dijon et particulièrement à Fabrice Martin-Laurent pour son accueil, à Nadine Rouard pour ses réponses à mes questions techniques, à Najoi El Azhari pour sa joie de vivre et à Marion Devers pour les cinétiques de minéralisation.

Je n'oublie pas Jean-Pierre Caudal qui a participé à la torture des vers avec son 'démouleur de carottes' et qui a accueilli une Gobio au pot du light!! Merci également à Oscar pour ses bons conseils et ses réflexions sur la société.

Avec le temps que l'on peut y passer, un laboratoire de recherche est un lieu de vie au-delà d'un lieu de travail et je tiens à remercier tous les 'jeunes chercheurs' qui m'ont permis de passer de très bons moments au sein du CAREN et en dehors à travers les 'pauses', les pots, les 'bouffes' chez les uns et les autres, les soirées 'n'importe quoi', les sorties bar, les concerts, les fléchettes, les colloques... : Emilie ma collègue de bureau préférée (allé courage !!), Nolwenn pour avoir été là au bon moment, Stéphane pour les soirées n'importe quoi (par exemple), Thomas pour l'ambiance des fins de soirées, Nico pour ses jeux de mots qu'on en redemande, Céline pour son accent du sud réchauffant, Yannick qui comprend mon désarroi de supportrice parisienne, Lisa et ses expériences de l'hémisphère sud, Erwan pour sa vision terre à terre de la recherche, Fabien pour le mode voix suave, Elise pour ses lasagnes trop sèches, Nuno comme gentil organisateur de soirées (boîte !!), Yann pour le karaoké (les voisins s'en souviennent), Fanny pour sa bonne humeur, Laure pour les rencontres du sous sol, Blaise, Ced pour les pauses badminton, Pipo (cheval), Guihlem, Denis, Fred pour son punch, Alexandrine et Guillaume pour m'avoir accueillie. Je n'oublie pas les expats : Chrys, Ben et Flo. En espérant n'avoir oublié personne...

Pour les anciennes, Laure, Audrey et Nadja, merci d'être présentes ce jour J et d'être venues me rendre visite en Bretagne, me revoilà parmi vous !

Merci tout particulièrement à Sébastien pour son soutien, ses encouragements, sa patience et encore bien plus. Merci d'être là et désolée de t'abandonner très bientôt !

Enfin un grand merci à mes parents qui m'ont permis d'en arriver là, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé à faire ce qu'il me plaisait.

Et surtout merci aux vers de terre pour s'être sacrifiés (pas forcément volontairement) pour la science et encore désolée pour l'ébouillantage, le sauna mortel et les maladies bizarres.

SOMMAIRE

CHAPITRE I : Introduction générale.....	5
1. La pollution des sols par les pesticides	7
1.1. La pollution des sols	7
1.2. Les pesticides : une problématique environnementale majeure	8
1.3. Cas de l'herbicide atrazine : états des lieux des pollutions	9
2. Le sol : support d'une biodiversité à l'origine de services écosystémiques.....	11
2.1. Les services écosystémiques	11
2.2. Le rôle des organismes du sol dans les services écologiques rendus	13
2.3. Relation biodiversité – fonctions de l'écosystème	16
2.4. Le sol, un milieu hétérogène constitué de domaines fonctionnels	18
3. La bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne.....	23
3.1. Le concept de bioturbation	23
3.2. La macrofaune lombricienne	25
3.2.1. Ecologie des lombriciens	25
3.2.2. La bioturbation par les lombriciens : modification de la physico-chimie du sol et impact sur les communautés microbiennes	26
4. Etude d'un service écosystémique : la biodégradation des herbicides en sols tempérés, cas de l'atrazine	29
4.1. Adaptation des bactéries du sol à la dégradation des polluants.....	29
4.2. Découverte des voies de dégradation de l'atrazine et isollements de bactéries dégradantes.....	32
4.2.1. Historique de la découverte des voies de dégradation de l'atrazine.....	32
4.2.2. Les gènes de dégradation de l'atrazine: apparition et dispersion.....	36
5. Les outils moléculaires en écologie fonctionnelle : de la diversité aux fonctions des bactéries.....	38
5.1. La diversité des bactéries du sol.....	39

5.2.	Fonctions et activités des bactéries du sol	42
5.3.	Un nouvel objectif : relier la diversité aux fonctions du sol.....	44
6.	Objectifs du travail de recherche.....	47
CHAPITRE II : Matériels et méthodes.....		51
1.	Dispositif expérimental et production de microsites de sol	53
1.1.	Matériel biologique.....	53
1.1.1.	Les lombriciens	53
1.1.2.	Les souches bactériennes dégradant l’atrazine.....	54
1.2.	Le sol	54
1.3.	L’atrazine.....	55
1.4.	Les microcosmes de sol	55
2.	Mesure de l’activité de minéralisation de l’atrazine	57
3.	Extraction des acides nucléiques de sol	58
3.1.	Extraction d’ADN de sol	58
3.2.	Extractions d’ARN : développement d’un protocole	59
Optimization of RNA extraction from small soil samples to quantify gene expression (article 1)		60
4.	Analyses moléculaires.....	78
4.1.	PCR quantitative.....	78
4.1.1.	Rappels du principe	78
4.1.2.	Préparation des standards	79
4.2.	RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)	80
4.3.	T-RFLP	81
4.4.	Clonage et séquençage.....	83
4.5.	Analyse des séquences, arbres phylogénétique et parcimonie maximale	83
5.	Mise en place du Stable Isotope Probing à partir d’ARN	85
5.1.	Principes et particularités de la technique	85

5.2.	Mise au point en conditions optimales	87
5.3.	Mise au point sur sol avec l'atrazine	88
5.3.1.	Détermination de la quantité d'atrazine à apporter	88
5.3.2.	Expérience préliminaire avec ¹⁴ C-éthyl atrazine.....	91
5.3.3.	Cinétique de dégradation de l'atrazine	94
6.	Traitements statistiques	95
CHAPITRE III : Rôle de la bioturbation associée à la bioaugmentation sur l'abondance, l'activité et la structure des bactéries indigènes et celles dégradant l'atrazine dans le sol		
.....		97
1.	Introduction	99
2.	Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil (article 2)	101
3.	Analysis of <i>atz</i> gene expressions during atrazine degradation in soil drilosphère (article 3)	125
4.	Bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne associée à la bioaugmentation	145
4.1.	Structure des communautés bactériennes dans les différents microsites de sol générés par la bioturbation après ou non bioaugmentation : analyses RISA	145
4.2.	Minéralisation de l'atrazine après bioaugmentation.....	147
4.3.	Quantification de l'expression des gènes <i>atzA</i> et <i>atzD</i> dans les microsites après inoculation du sol par <i>Pseudomonas</i> sp. ADP	149
4.3.1.	Expression des gènes <i>atzA</i> et <i>atzD</i> dans le sol bioaugmenté non bioturbé	149
4.3.2.	Expression du gène <i>atzD</i> dans les microsites de sol bioaugmentés	150
4.4.	Discussion.....	151
5.	Synthèse du chapitre III.....	154
CHAPITRE IV : Rôle de la bioturbation sur la diversité des communautés bactériennes du sol actives et sur celles dégradants un substrat carboné simple ou complexe (atrazine)		
.....		157
1.	Introduction	159
2.	Short-term response of soil bacteria to carbon enrichment in different soil microsites (article 4)	161

3. Identification of atrazine-degraders under soil bioturbation by earthworms by RNA-SIP (article 5)	180
4. Synthèse du chapitre IV	207
CHAPITRE V : Conclusions et perspectives	211
1. Les avancées fondamentales acquises	214
1.1. Une survie différente des bactéries du sol à l'ingestion par les lombriciens.....	216
1.2. Les parois de galeries : un microsite particulier pour les bactéries dégradant l'atrazine.....	217
1.3. Relation hétérogénéité - diversité bactérienne - fonction.....	218
1.4. L'adaptation des bactéries du sol : un déterminant initial majeur.....	219
1.5. Dégradation de l'atrazine et changement d'échelles	220
1.6. Avancées sur les voies de dégradations de l'atrazine.....	221
2. Perspectives de recherche.....	223
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227
ANNEXES	245

CHAPITRE I

Introduction générale

1. La pollution des sols par les pesticides

1.1. La pollution des sols

Ce travail de recherche s'inscrit dans le contexte de pollution diffuse des sols par les molécules xénobiotiques qui par définition sont des substances possédant des propriétés toxiques même à de très faibles concentrations. Bien que ces xénobiotiques puissent être d'origine naturelle et utilisés dans le cadre de la compétition inter-espèces (Coleman et al., 1997), une majorité a une origine anthropique.

Une pollution est définie comme une introduction dans l'environnement (air, eau, sol) de substances portant atteinte à la santé humaine et aux écosystèmes. Elle est essentiellement liée aux activités humaines. Ainsi, la révolution industrielle entamée au XIX^{ème} siècle a largement contribué à l'état de pollution actuel de notre environnement. La prise de conscience des atteintes à l'environnement n'est que relativement récente puisque le premier meeting international sur les sols pollués n'a eu lieu qu'en 1985 au Pays Bas. Ce fut l'occasion de reconnaître le besoin de comprendre les processus à l'origine de ces pollutions et de trouver des moyens possibles de dépollution (Assink and Van den Brink, 1986).

Les pollutions du sol sont d'origine industrielle, agricole ou urbaine et ces différentes sources entraînent la présence de nombreuses molécules xénobiotiques différentes. Les polluants organiques d'origine industrielle incluent le pétrole et ses dérivés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et les hydrocarbures chlorés (Van der Perk, 2006). Ainsi, sous la classe des HAPs, on retrouve plus de 100 molécules différentes utilisées dans la fabrication des médicaments, des teintures, des plastiques ou des pesticides. Parmi les hydrocarbures chlorés utilisés dans l'industrie, on retrouve les PolyChloroBiphényles (PCBs également dénommés pyralènes) qui ont été largement utilisés pour leur qualité d'isolation électrique, de lubrification et d'inflammabilité. Malgré l'arrêt de leur production dans le monde dans les années 1970-1980, les PCBs persistent dans l'environnement. Dans leur ensemble, ces polluants ont des effets cancérogènes, peuvent se fixer sur l'ADN, sont à l'origine de dérèglements hormonaux, créent des lésions du foie, de la peau et du système nerveux central (Mirsal, 2004; Van der Perk, 2006). Les polluants organiques d'origine agricole incluent les fertilisants et les pesticides.

1.2. Les pesticides : une problématique environnementale majeure

L'utilisation des pesticides par l'agriculture présente deux aspects aux conséquences totalement opposées. Le premier concerne la nécessaire réduction des dégâts causés aux cultures par des organismes phytopathogènes et du développement des adventices pour maintenir la productivité alors que le deuxième tient à la nature même des pesticides qui en fait, dans certaines conditions, de possibles polluants de l'air, des eaux, des aliments et des sols (Calvet et al., 2005).

Selon leur cible (insecticide, herbicide ou fongicide) les pesticides sont des molécules de natures diverses : composés organophosphorés (TEPP), organochlorés (DDT, 2,4-D, alachlore), dérivés de carbamate (carbofurane), de triazine (atrazine, simazine), d'acide barbiturique... (Mirsal, 2004). Ces composés présentent des propriétés cancérigènes, mutagènes, tératogènes et allergènes. A cause de leur utilisation importante notamment en France qui représente près de 30% du marché européen (figure I-1), les pesticides sont fréquemment détectés dans les eaux de surface et les eaux souterraines (IFEN 2007).

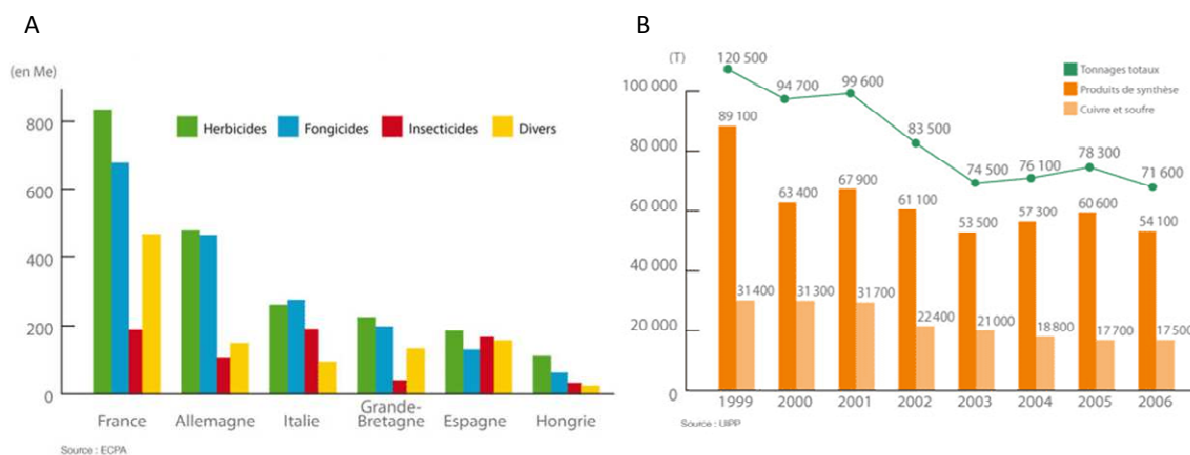


Figure I-1 : A. Principaux marchés phytosanitaires en Europe en 2005 (total = 7 166 millions d'euros), B. Tonnage des substances actives vendues en France de 1999 à 2006 (Union des industries de la protection des plantes, 2008).

Une grande partie des pesticides transite par le sol où ils sont apportés directement ou indirectement par l'eau et les retombées atmosphériques. Ainsi, lorsque la molécule est à la surface du sol, elle peut être soumise à un phénomène de volatilisation et se retrouver dans l'atmosphère (Bedos et al., 2002). Ce phénomène de volatilisation implique une diffusion des pesticides car ceux-ci seront redéposés avec les eaux de pluie à un autre endroit que celui où la contamination ou l'application a eu lieu. Ainsi, en Suède des pesticides tels que le 2,4-D ou

l'atrazine qui n'ont jamais été utilisés dans ce pays ont été détectés dans les eaux de pluie (Kreuger and Kylin, 2006).

Les pesticides utilisés en agriculture ayant des compositions et des structures très variées, leur propriétés physiques, chimiques et biologiques le sont aussi ce qui explique les difficultés rencontrées pour décrire et prévoir leur devenir dans les sols (figure I-2). Une fois que la molécule a pénétré dans le sol, elle est soumise à des phénomènes de rétention, d'adsorption, d'infiltration, de diffusion qui sont contrôlés par les propriétés du pesticide et du milieu. Elle peut également être transportée par la solution du sol et être entraînée dans les eaux souterraines par des processus d'infiltration et de percolation (Yaron et al., 1996; Mirsal, 2004). Lorsqu'il se trouve dans le sol, le pesticide peut être dégradé par des processus abiotiques (photodécomposition, réactions d'oxydo-réduction, d'hydrolyse...) ou biotiques réalisés par les microorganismes du sol, limitant ainsi les contaminations.

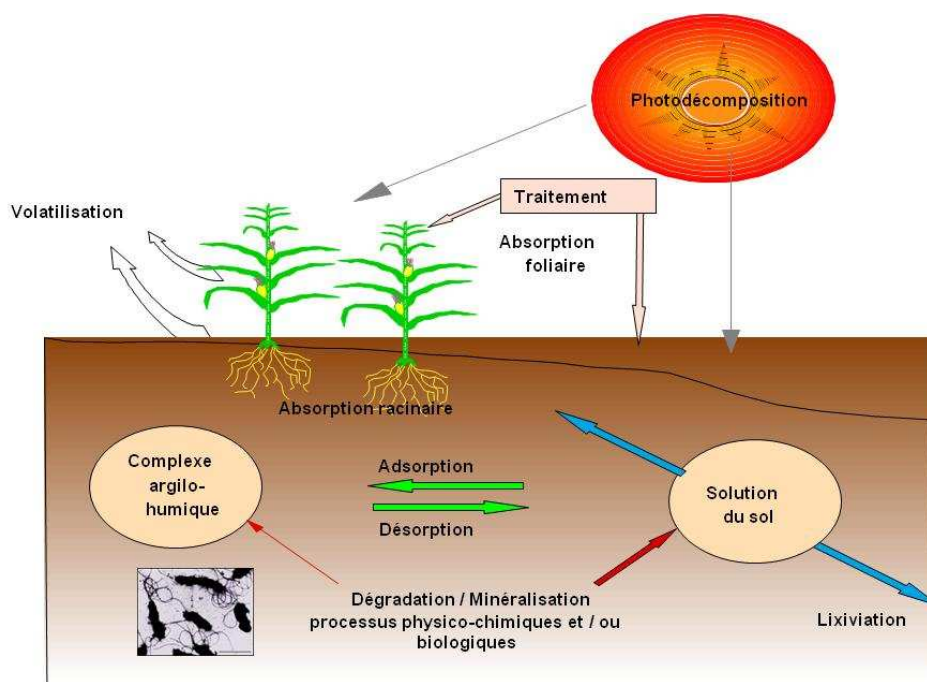


Figure I-2: Schéma conceptuel des voies d'évolution des pesticides (Kersante, 2003)

1.3. Cas de l'herbicide atrazine : états des lieux des pollutions

Afin de mener la présente étude, l'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) (figure I-3), herbicide de la famille des triazines, a été utilisée comme molécule polluante modèle. Commercialisée en 1962, l'atrazine a été utilisée en agriculture principalement comme désherbant du maïs ou du sorgho mais elle a également été épandue comme herbicide total sur les routes, les voies publiques, les voies ferrées et les terrains non

cultivés. Cette molécule est un inhibiteur de la photosynthèse agissant au niveau du photosystème II. Elle est absorbée par les plantes au niveau des racines et transportée jusqu'aux feuilles, organes cibles, où elle bloque le transfert réducteur d'électrons de la photosynthèse rendant impossible la conversion de l'énergie lumineuse en énergie électrochimique et conduisant à une mort cellulaire (Fedke, 1982).

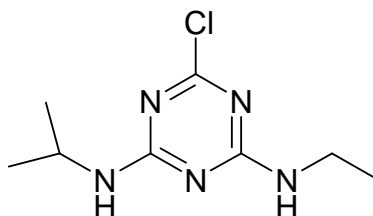


Figure I-3 : Molécule d'atrazine

L'utilisation de l'atrazine comme molécule modèle présente différents intérêts. Tout d'abord, cet herbicide a été mondialement utilisé durant les 50 dernières années, et cet usage sur le long terme a entraîné une adaptation des bactéries du sol à sa dégradation. Ainsi, de nombreuses études de ces mécanismes de biodégradation ont été réalisées permettant d'élucider les voies de dégradation et les gènes impliqués et d'isoler certaines bactéries dégradantes.

Ensuite, l'atrazine étant un herbicide facile d'emploi, efficace et de faible coût, elle a été appliquée massivement, en résultant une contamination chronique des sols, des eaux souterraines et de surface. Ainsi en France son utilisation a atteint 5 000 tonnes annuelles (Miquel, 2003) en faisant le principal polluant des eaux de surface et souterraines et entraînant des restrictions d'usage à partir de 1997 et son interdiction totale en France en 2003. Malgré cette interdiction, un effet retard des contaminations est observé puisque selon le dernier rapport de l'institut français de l'environnement (IFEN 2007), l'atrazine et ses métabolites sont retrouvés et quantifiés dans 20 à 31 % des analyses effectuées en eaux superficielles et dans 2.5 à 32.4 % des analyses effectuées en eaux souterraines où l'atrazine et ses métabolites sont les premiers polluants détectés (figure I-4). Ces résultats sont inquiétants étant donné la toxicité aquatique aiguë de l'atrazine qui est de 0.011 mg L⁻¹ (Carrasco and Sabater, 1997).

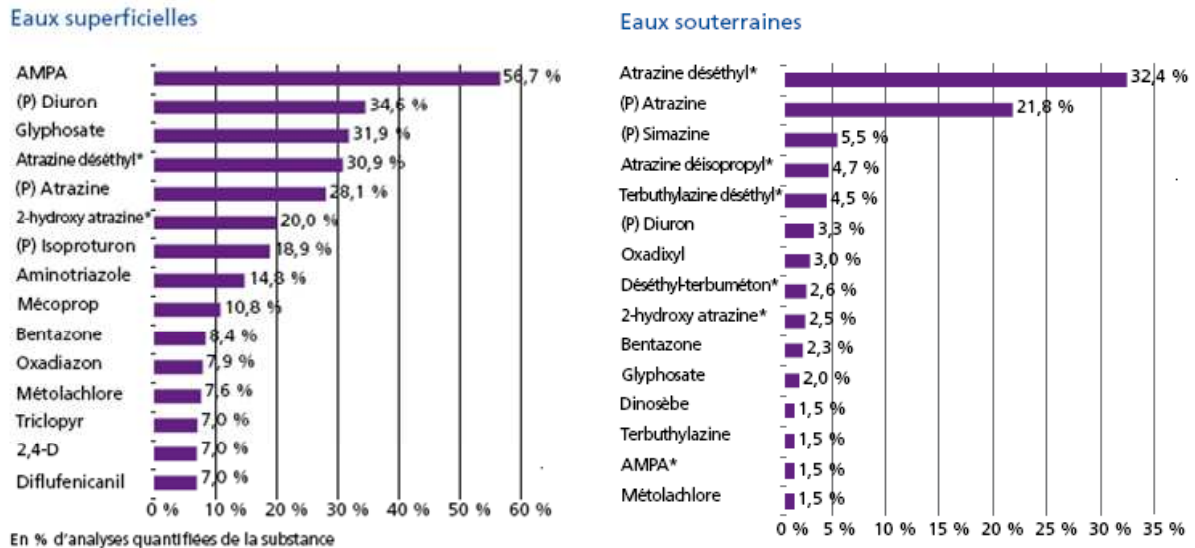


Figure I-4: Principales molécules quantifiées tout réseaux confondus en 2005 en eaux superficielles et souterraines. En pourcentage d'analyses quantifiées de la substance (IFEN 2007)

Enfin, malgré sa forte toxicité et ses temps de rémanence importants, l'atrazine est toujours utilisée massivement en Amérique du nord. Ainsi, en 2000, 947 tonnes d'atrazine ont été importées au Canada (registre environnemental de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement, 2006) et en 2003, l'atrazine était l'herbicide le plus utilisé aux Etats-Unis (Knight, 2003). En 2006, l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA) a renouvelé l'autorisation d'utilisation de l'atrazine entamée en 2003, justifiant qu'il y a une certitude qu'aucun mal pour la population américaine ne résultera d'une exposition à des résidus d'atrazine à partir de nourriture ou d'eau potable (US EPA, memorandum of atrazine decision document, 2006). Cette décision est prise alors que des scientifiques américains dénoncent des pressions de l'industrie agroalimentaire pour essayer d'étouffer et de discréditer leurs travaux sur l'atrazine (Knight, 2003).

2. Le sol : support d'une biodiversité à l'origine de services écosystémiques

2.1. Les services écosystémiques

Les écosystèmes naturels sont fournisseurs de services écosystémiques aux fonctions très larges : réserve de différentes denrées (nourriture, eau, combustibles...), support de la vie (formation du sol, cycle des nutriments, pollinisation...), régulation du fonctionnement des écosystèmes (régulation du climat, contrôle des maladies, détoxification...) et services culturels non associés à un bénéfice matériel (Barrios, 2007). Le sol contribue à tous ces

services écologiques rendus à l'homme: support physique de l'agriculture, conservation et distribution des nutriments aux plantes, décomposition de la matière organique morte et des déchets (résidus agricoles, déchets industriels...), recyclage des nutriments et régulation des cycles des éléments majeurs (carbone, azote, soufre, phosphore) (Buol, 1995; Lavelle and Spain, 2001).

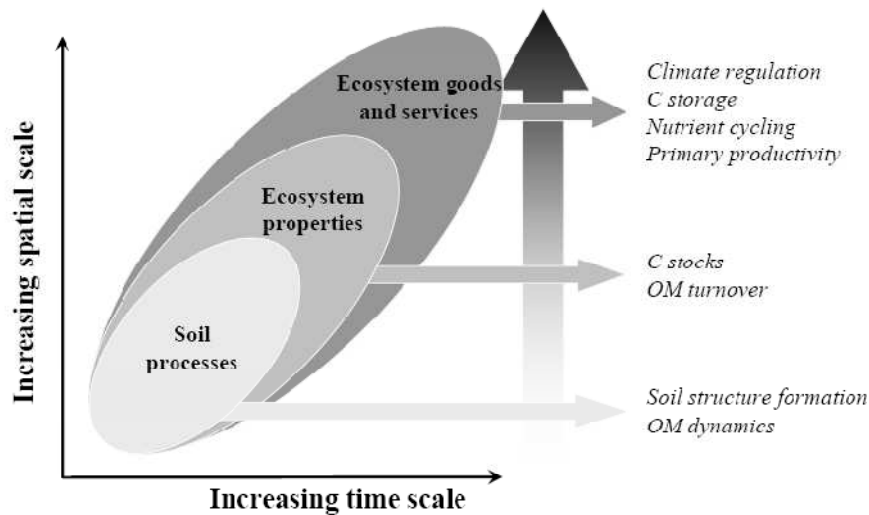


Figure I-5 : modèle hiérarchique de l'impact des processus générés par la faune du sol à une micro-échelle sur les services écologiques fournis par le sol (Decaens et al., 2006)

La majorité de ces services est fournie par l'activité des nombreux organismes vivants habitant le sol et dont les effets sont encore trop peu étudiés (figure I-5) (Lavelle et al., 2006). Plus encore, alors que les interactions biotiques régissent le fonctionnement du sol, leurs rôles dans les services écologiques rendus demeurent très peu renseignés. Ainsi, nous savons que les microorganismes du sol réalisent 90% des transformations chimiques intervenant dans le cycle de la matière organique et la fertilité chimique du sol et qu'ils sont capables de dégrader différents polluants en les utilisant comme source nutritive (Prosser, 2002; Lavelle et al., 2005). Nous savons également que les invertébrés vivant dans le sol jouent un rôle primordial dans le fonctionnement continu de cet écosystème. En modifiant ses propriétés physiques, chimiques et biologiques ils agissent sur la circulation de l'eau, le cycle des nutriments, la production primaire, la formation du sol et la régulation du climat (Lavelle et al., 2006). Néanmoins, très peu d'informations concernant les interactions entre ces invertébrés et les microorganismes sont disponibles.

L'ensemble des organismes du sol interagit par des liens trophiques étroits influençant ainsi les différents processus et fonctions supportés par le sol. Ces réseaux trophiques relient les structures des communautés du sol aux fonctions de l'écosystème puisque ces interactions

trophiques correspondent à des taux de transferts participant aux cycles de matière, d'énergie et de nutriments (de Ruiter et al., 2002).

2.2. Le rôle des organismes du sol dans les services écologiques rendus

Le sol renferme une grande partie de la biodiversité présente sur Terre et joue un rôle majeur dans les processus intervenant dans les cycles de la matière, de l'énergie et des nutriments (Wolters, 1997; Griffiths et al., 2000). La biomasse du sol présente dans les 25 premiers centimètres de la couche de surface transforme de 10 à 1000 tonnes de matière organique fraîche par hectare et par an (de Ruiter et al., 2002). Les microorganismes du sol, qui se situent à la base de la chaîne alimentaire de cet écosystème jouent un rôle primordial dans l'élaboration des services écosystémiques rendus par le sol en étant les premiers acteurs des cycles biogéochimiques (Lavelle et al., 2006). Néanmoins, il ne faut pas négliger le rôle des racines et de la faune du sol qui modèlent les communautés microbiennes et régulent leur activité au sein d'interactions complexes et à échelles multiples (tableau I-1). Ainsi, les communautés microbiennes dans le sol ont un turnover variant généralement de 6 à 18 mois ce qui est entre 1000 et 10 000 fois plus lent que les taux de croissances observés en culture au laboratoire (Lavelle et al., 1995). Cette apparente contradiction entre les observations des espèces cultivables en laboratoire et les mesures faites au champ a été qualifiée de 'sleeping beauty paradox' ou paradoxe de la belle au bois dormant. Bien qu'ayant la capacité de dégrader une très large gamme de substrats présents dans le sol, les microorganismes semblent être inactifs la plupart du temps. Cela est dû à de fortes carences nutritives résultant de leur incapacité à se mouvoir jusqu'à un autre substrat lorsque celui de leur environnement est consommé (Lavelle et al., 2005). Ainsi tout phénomène physique généré par un autre organisme du sol (racines, lombriciens, fourmis, termites...) qui amènera les microorganismes à un nouveau substrat jouera le rôle du 'prince charmant' et réveillera ces communautés en dormance (Lavelle et al., 1995).

Les invertébrés du sol occupent donc une position stratégique au sein des structures et des processus qui relient les processus microbiens aux échelles supérieures (e.g. parcelle), là où les services de l'écosystème sont produits. Ces interactions entre les racines, la faune et les microorganismes du sol sont à l'origine des nombreux services écologiques rendus par cet écosystème.

Tableau I-1 : Contribution des invertébrés du sol aux services écosystémiques fournis par le sol (Lavelle et al., 2006)

Service types	Goods/services	Ecosystem process	Soil invertebrate contribution	Indicator of faunal contribution
Production	Water supply	Infiltration and storage of water in soil pore systems	Building and maintenance of stable porosity through bioturbation and burrowing	Proportion and arrangement of biogenic structures in soil Water-holding capacity
Support	Nutrient cycling	Decomposition Humification Regulation of nutrient losses (leaching denitrification)	Comminution, selection/activation of microbial activities	Litterbag decomposition assessments Profile of soil organic matter Measure of Organic matter content in the different soil fractions
		Soil formation	Pedogenesis	DNA and NIRS analyses in biogenic structures
	Primary production	Stimulation of symbiotic activity in soil Indirect production in the soil of molecules recognized by plants as hormones Protection against pests and diseases communities	Selective microbial enhancement in functional domains Control of pests through biological interactions; enhanced capacity of plant response	Soil and humus morphology Soil DNA assessments
Regulation	Flood and erosion control	Regulation of water runoff	Creation of surface roughness by biogenic structures	Soil faunal communities Indices of plant vigor
		Infiltration and storage of water in soil	Building and maintenance of stable porosity through bioturbation and burrowing	Production of biogenic structures Soil and humus morphology
	Climate regulation	Production/consumption of greenhouse gases Organic matter storage in soil and biomass	Organic matter sequestration in stable biogenic macro-aggregates Enhanced formation of resistant humic compounds	Stable biogenic macro-aggregates

Les propriétés physiques du sol sont en grande partie contrôlées par l'action de la macrofaune du sol. Ainsi, des changements drastiques des communautés de la macrofaune du sol ont significativement changé le profil du sol dans des périodes de temps très courtes (Lavelle et al., 2006). La formation d'agrégats est principalement due à l'utilisation des apports organiques par les invertébrés du sol qui les transforment jusqu'à leur utilisation par les racines ou d'autres invertébrés du sol ce qui va générer la formation d'agrégats solides et persistants (Blanchart et al., 1999). De plus en créant la porosité structurale du sol, les invertébrés favorisent l'infiltration et le stockage de l'eau dans le sol (Lavelle et al., 2006).

La faune du sol et son interaction avec les microorganismes jouent un rôle primordial dans la minéralisation des nutriments et donc dans leur acquisition par les plantes (Cole et al., 2006) : la présence de la faune dans le sol augmente la minéralisation de l'azote issu de la litière ou de l'humus et le prélèvement de nitrate ou d'ammonium par les racines (Anderson, 1988). De plus le broutage (grazing) de la biomasse microbienne stimule également la croissance des plantes en limitant leur compétition avec les microorganismes pour les nutriments inorganiques (Mikola et al., 2002).

La décomposition de la matière morte et des déchets est réalisée à différentes échelles. Dans un premier temps la faune du sol fragmente la matière morte puis les microorganismes

interviennent en ‘cassant’ ces composés organiques complexes (Mikola et al., 2002). De plus, il a été montré que l’activité biotique de certains macroarthropodes augmentait les taux de décomposition de la litière en exposant une plus grande surface de ressource à l’attaque microbienne (Anderson, 1988). Les microorganismes du sol sont également fortement impliqués dans la biodégradation des molécules anthropiques et plus ou moins toxiques déposées accidentellement ou sciemment à la surface du sol, limitant ainsi les contaminations.

Le sol exerce également une régulation des cycles des éléments majeurs grâce aux différentes interactions existant entre les organismes du sol et à l’activité propre de chacun. Par exemple, la séquestration du carbone dans des agrégats compacts et stables formés par les invertébrés du sol est un processus important par lequel le sol accumule le carbone et limite ainsi sa libération rapide dans l’atmosphère sous la forme de gaz à effet de serre (Lavelle et al., 2006). Concernant le cycle de l’azote, il a été montré que la consommation de la biomasse microbienne par la faune du sol avait un rôle important dans la libération d’azote minéral (Anderson, 1988).

L’ensemble de ces services écosystémiques rendus par le sol dépend donc étroitement de l’activité des organismes s’y développant et de leurs interactions. Il est également important de préciser les liens étroits existant entre les organismes vivant sous le sol et ceux vivant au dessus, notamment les plantes qui se situent à l’interface entre les deux (‘aboveground-belowground’). Ainsi, puisque les espèces de plantes diffèrent en terme de quantité et de qualité des ressources qu’elles fournissent au sol, une espèce particulière de plante peut avoir des effets importants sur les organismes vivant dans le sol et les processus qu’ils régulent (Wardle et al., 2004) (Figure I-6).

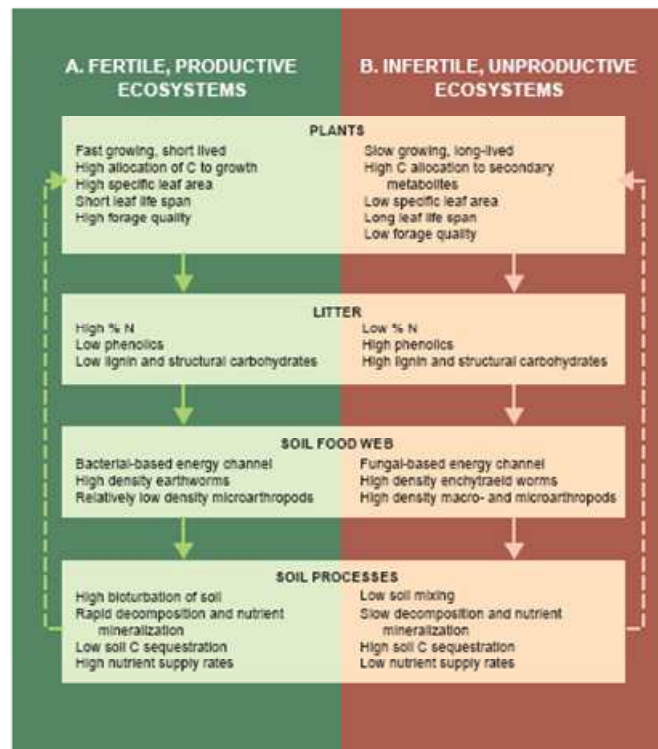


Figure I-6 : Différences fondamentales entre (A) un système fertile et (B) un habitat non fertile. Les caractéristiques des plantes déterminent la qualité et la quantité des ressources qui pénètrent dans le sol et les processus écologiques clés dans le système de décomposition réalisé par la faune du sol. Ces liens entre le 'belowground' et le 'aboveground' sont rétrocontrôlés au niveau de la plante soit positivement en conditions fertiles (A) soit négativement dans le système non fertile (B). (modifié d'après Wardle et al., 2004).

2.3. Relation biodiversité – fonctions de l'écosystème

Alors que nous venons de voir que le fonctionnement du sol et les services qu'il fournit sont supportés par les différents organismes vivant dans cet écosystème, eux-mêmes sous le contrôle de différents facteurs (figure I-7) une question importante en écologie mais aussi relative au maintien de nos ressources se pose : quelle est la relation entre la biodiversité et les fonctions de cet écosystème ? Cette question est un débat à part entière puisque différentes hypothèses supportées par plusieurs exemples ont été développées.

Afin de répondre à cette question, il est tout d'abord nécessaire de définir les différentes notions impliquées. Ainsi, la biodiversité correspond à la totalité des espèces dans un écosystème, comprenant la variation génétique présente dans les populations. Cette notion englobe donc implicitement les relations existant entre les différentes espèces (Swift et al., 2004; Coleman and Whitman, 2005). La biodiversité peut être décrite en termes de nombre d'entités, de leur distribution et des différences de leurs traits fonctionnels (Hooper et al., 2005). Les fonctions de l'écosystème quant à elles constituent les processus biochimiques, biologiques et biophysiques qui assurent la productivité biologique, l'intégrité et la

maintenance de l'écosystème (Swift et al., 2004). La maintenance (viabilité) et la résilience de l'écosystème sont des points majeurs dans l'étude de la relation biodiversité – fonctions.

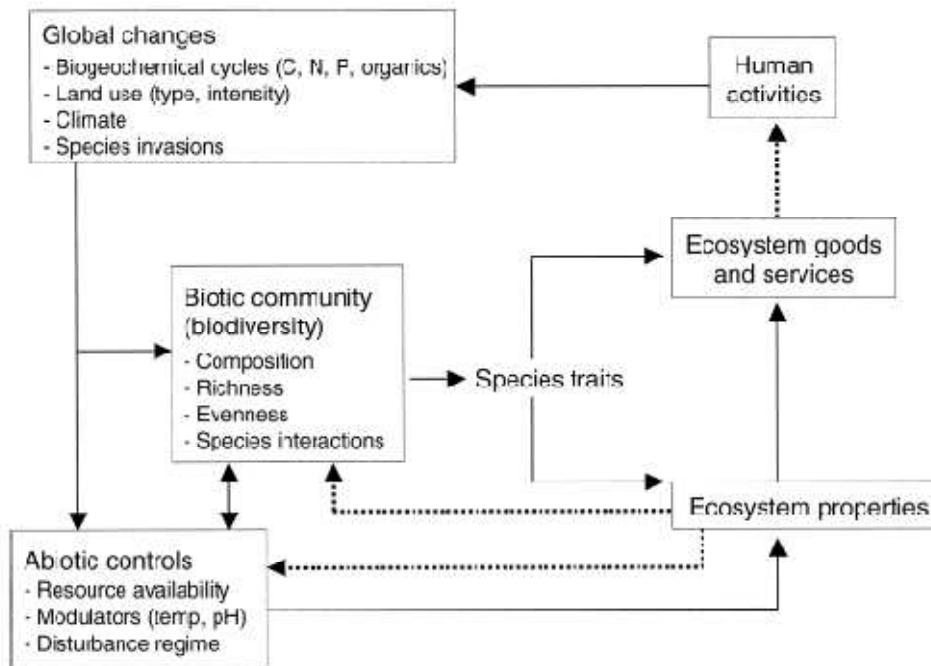


Figure I-7 : Impact des activités humaines, des changements globaux et des contrôles biotiques et abiotiques sur les propriétés de l'écosystème. De nombreux aspects de la communauté biotique influencent la portée et la proportion des traits des espèces qui modifient ensuite les contrôles abiotiques (Hooper et al., 2005).

Deux hypothèses concernant la relation entre la biodiversité et les fonctions du sol (et des écosystèmes en général) ont été proposées (figure I-8) (Bengtsson, 1998; Schwartz et al., 2000; Barrios, 2007):

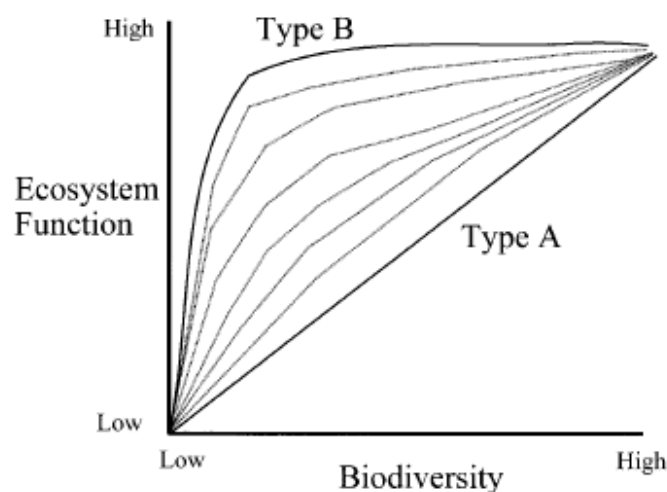


Figure I-8 : Relations hypothétiques entre la biodiversité et les fonctions de l'écosystème (Schwartz et al., 2000).

- Relation linéaire (figure I-8, type A) : toutes les espèces, même celles rares, contribuent à une fonction du sol. Cette hypothèse est soutenue par Wolters et al. (2001) par

opposition au type B. Les organismes du sol seraient constitués d'un groupe riche en espèces dont les fonctions sont redondantes, les 'passagers' et d'un petit groupe d'espèces fonctionnellement importantes, les 'conducteurs'. Ainsi, l'impact fonctionnel de la perte d'un certain nombre d'espèces suivrait une fonction en escalier dont le nombre de marches correspondrait au nombre de 'conducteurs', leur largeur à la part de chaque 'conducteur' et leur hauteur à l'impact fonctionnel de ces espèces.

- Relation non linéaire (figure I-8, type B) : les fonctions du sol sont maximisées par une faible proportion de la diversité totale et la plupart des espèces rares ne contribuent pas matériellement au maintien d'une fonction. Cette hypothèse est basée sur le fait que la richesse spécifique des espèces dans le sol est supérieure à la diversité fonctionnelle (théorie de la redondance fonctionnelle, Loreau, 1998) et suggère que les écosystèmes peuvent perdre une grande partie de leur diversité sans conséquence sur leurs fonctions. Dans ce cas, il existerait néanmoins une richesse spécifique seuil pour le maintien des fonctions du sol. Cette seconde hypothèse s'appuie sur la présence d'espèces clés qui ont des effets importants sur les communautés ou les écosystèmes et sur la notion de groupes fonctionnels dont les interactions avec la diversité expliqueraient la plupart des mécanismes impliqués dans les fonctions du sol (Bengtsson, 1998).

En pratique, la relation biodiversité – fonctions du sol est complexe et des résultats opposés ont été obtenus. Ainsi, selon les études, l'hypothèse A ou B est vérifiée, néanmoins l'hypothèse d'une relation linéaire est beaucoup moins observée (Schwartz et al., 2000). Dans le cas de l'hypothèse B, certaines études montrent la présence d'espèces clés dont la déletion a un effet significatif sur les autres espèces mais ces espèces clés identifiées ne sont pas forcément les mêmes dans un même réseau trophique selon les études (Moore and de Ruiter, 2000; Hunt and Wall, 2002).

Malgré ces résultats contradictoires, et peu importe l'hypothèse soutenue, la biodiversité au sein du sol a des fonctions écologiques importantes car elle permet à l'écosystème de s'autoréguler et d'augmenter sa résilience. Une grande diversité génère une certaine stabilité au sol et lui permet d'être plus résistant aux stress et perturbations auxquels il est soumis (Swift et al., 2004; Hooper et al., 2005; Barrios, 2007).

2.4. Le sol, un milieu hétérogène constitué de domaines fonctionnels

Le sol est un milieu hétérogène en raison d'une combinaison de facteurs biotiques (prédation, compétition...) et abiotiques (température, pH, disponibilité du substrat...)

(Franklin and Mills, 2003). Lavelle et Spain (Lavelle and Spain, 2001) ont ainsi décliné l'hétérogénéité du sol en trois niveaux :

- Une hétérogénéité spatiale qui se retrouve à différentes échelles (de l'échelle continentale à celle des micro-agrégats)
- Une hétérogénéité temporelle due aux différentes échelles de temps auxquelles se déroulent les différentes transformations physiques et chimiques supportées par le sol
- Une hétérogénéité fonctionnelle liée à la diversité des processus intervenant au sein de cet écosystème.

Cette hétérogénéité du sol s'associe à des variations importantes des paramètres physico-chimiques qui le caractérisent (matières minérale et organique, texture, teneur en eau, présence ou non d'oxygène, pH, température, lumière...). Ces variations génèrent des habitats variés associés à des sources nutritives diverses, il en résulte une hétérogénéité dans la distribution des organismes du sol interagissant avec l'hétérogénéité des ressources. Ces interactions spatiales complexes peuvent être altérées par des perturbations locales aléatoires comme par exemple une réduction de la biomasse d'un organisme dominant ou une altération de la structure physique du sol (figure I-9) (Ettema and Wardle, 2002).

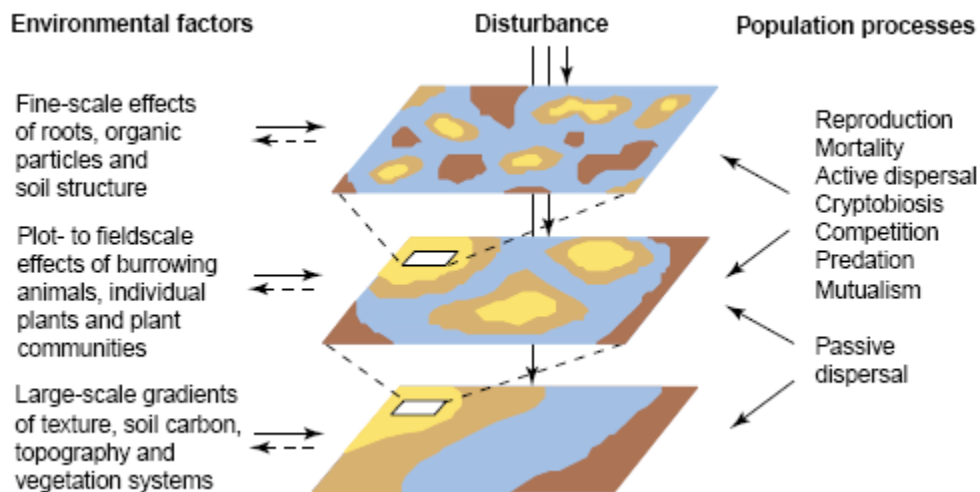


Figure I-9 : Déterminants de l'hétérogénéité spatiale des organismes du sol (Ettema and Wardle, 2002).

La distribution hétérogène des organismes du sol se situe à différentes échelles spatiales emboîtées les unes dans les autres qui dépendent de la taille des individus. D'un point de vue fonctionnel, une organisation hiérarchique a également été décrite, permettant une meilleure compréhension du rôle joué par les différents organismes dans les fonctions globales du sol et une identification des différentes échelles auxquelles ils interviennent. Ces domaines fonctionnels sont constitués de zones du sol influencées par un 'régulateur' majeur

biotique ou abiotique et opèrent à différentes échelles spatiales et temporelles (Beare et al., 1995; Lavelle, 2002). Chaque structure existant dans le sol appartient à un domaine fonctionnel et certains de ces domaines peuvent être très proches physiquement, rendant difficile leur délimitation précise (Lavelle, 2002). Certains de ces domaines fonctionnels constituent une zone où l'activité biologique est stimulée, ils sont alors qualifiés de 'hot spot' (Sextone et al., 1985; Joergensen, 2000; Bundt et al., 2001; Nannipieri et al., 2003).

Beare et al. (1995) ont tout d'abord distingué 5 domaines fonctionnels (sphères biologiques d'influence) différents (figure I-10) constitués de:

- la détritosphère : zone du sol incluant la litière et le sol adjacent influencé par cette litière. Cette zone a une forte activité microbiologique due à l'activité des décomposeurs (bactéries et champignons) (Ingwersen et al., 2007). La détritosphère abrite également une partie de la mésofaune du sol correspondant à des microarthropodes et à des petits oligochètes se nourrissant soit de litière, soit de microorganismes, soit de petits invertébrés.
- la drilosphère : zone de sol influencée par l'activité des lombriciens incluant le ver lui-même (son micro-environnement interne et sa surface externe en contact avec le sol), les turricules qui sont les déjections des vers et les galeries qu'ils forment (Lavelle, 1988; Brown et al., 2000).
- la porosphère : arrangement entre le vide et la matière dans le sol (Vannier, 1987). Ces pores sont remplis d'air et/ou d'eau, et sont une source d'habitats pour les petits organismes du sol vivant dans des films d'eau comme les protozoaires ou pour de plus gros organismes vivant en aérobie dans les pores les plus grands tels que des individus correspondant à la mésofaune du sol (Beare et al., 1995; Lavelle and Spain, 2001).
- l'agrégatosphère : ensemble des agrégats du sol qui sont des groupes de particules de sol regroupées ensemble et formant des unités de taille supérieure. Les cycles du carbone et de l'azote dans le sol sont intimement dépendant de l'agrégation des particules dans le sol (Brown et al., 2000). L'agrégatosphère constitue l'habitat principal des microorganismes du sol qui représentent 90% de la biomasse totale du sol, un gramme de sol peut contenir jusqu'à 10 milliards de microorganismes de milliers d'espèces différentes (Rossello-Mora and Amann, 2001; de Ruiter et al., 2002). Néanmoins, l'espace occupé par les microorganismes dans le sol représente généralement moins de 5% de l'ensemble de l'espace disponible (Nannipieri et al., 2003). Sous l'appellation de microorganismes sont regroupés les virus, bactéries, champignons et l'ensemble des eucaryotes unicellulaires habitant cet écosystème. Ils peuvent soit vivre à l'intérieur des micro-agrégats (dans les micropores) ou bien à leur

surface. Ces deux habitats correspondent à deux stratégies différentes puisque en vivant à l'intérieur, les microorganismes limitent la prédation mais également leurs ressources trophiques disponibles. Par contre en vivant à la surface de ces micro-agrégats, les microorganismes s'exposent à une pression constante sur leur population liée à la prédation et l'instabilité environnementale même si le milieu est plus riche d'un point de vue nutritif (Postma and van Veen, 1990; Lavelle et al., 2006). Cette distribution d'apparence mineure est essentielle dans le cadre de techniques de bioremédiation par bioaugmentation puisque les microorganismes dégradants inoculés pourraient se maintenir plus longtemps dans le sol en étant protégés dans ces micro-agrégats.

- la rhizosphère (Hiltner, 1904): zone d'influence directe des racines dans le sol qui occupent en général de 1 à 5% du volume du sol superficiel selon la végétation présente en surface (Killham, 1994). Les racines fournissent de l'énergie et des nutriments en produisant de la matière organique lorsqu'elles meurent et en sécrétant de nombreux exsudats (facteurs de croissance, hormones...) lorsqu'elles sont vivantes (Lavelle and Spain, 2001), elles abritent ainsi une grande part de la biomasse vivante du sol. Elle sont par exemple une source d'habitat pour certains nématodes (Lavelle and Spain, 2001). L'activité microbienne et consécutivement le broutage sont ainsi stimulés dans la rhizosphère (Beare et al., 1995). Les racines constituent également un habitat pour différents symbiontes comme les champignons mycorrhiziens à arbuscules qui colonisent plus de 80% des plantes terrestres et qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions écologiques dont la nutrition en phosphore des plantes ou encore les PGPR (Plant growth Promoting Rhizobacteria) impliquées dans la phytoprotection (Selosse et al., 2004). La symbiose entre les plantes légumineuses et la bactérie *Rhizobium* dont l'association produit des nodules impliqués dans la fixation du N₂ atmosphérique est très importante dans le cycle de l'azote (Werner, 1992).

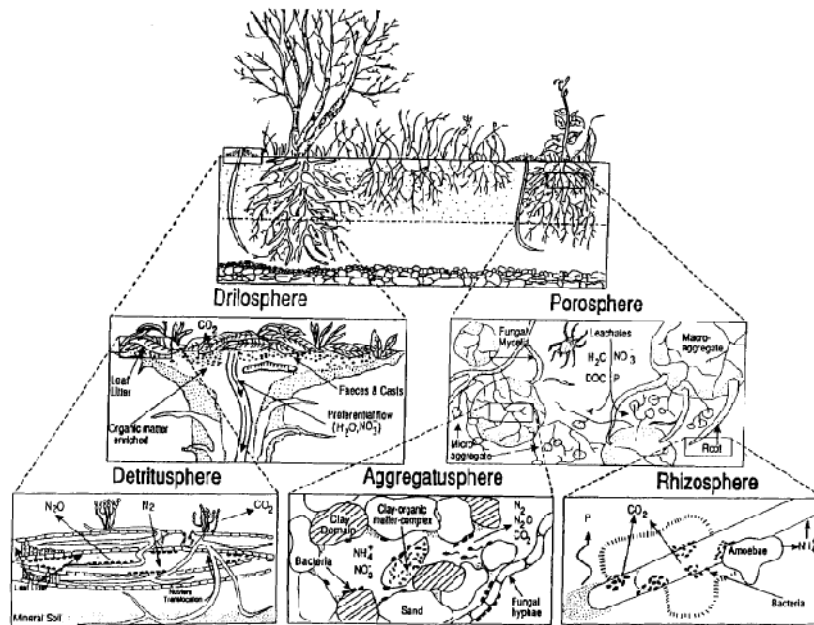


Figure I-10 : Vue hiérarchique de la biodiversité et des domaines fonctionnels associés, les sphères biologiques d'influence (Beare et al., 1995).

Lavelle a par la suite proposé une autre approche hiérarchique en distinguant le 'régulateur', les structures qu'il génère et les organismes vivant dans l'environnement créé (Lavelle, 2002). Il distingue ainsi différents régulateurs (figure I-11):

- les organismes 'ingénieurs des sols' (Jones et al., 1997) tels que les lombriciens, les termites et les fourmis qui créent leur propre domaine fonctionnel : la drilosphère, la termitosphère et la myrmécosphère. Ces organismes sont les composants les plus importants de la macrofaune du sol (Lavelle and Spain, 2001) et transforment le sol en matériels structurés influençant les transferts de nutriments utilisés par d'autres organismes (Lavelle, 2002)
- Les plantes qui sont à l'origine de la rhizosphère et du 'système litière' formé par l'accumulation de feuilles et de pousses mortes se déposant à la surface du sol
- Les régulateurs abiotiques avec par exemple les effets du gel/dégel qui provoquent une bioturbation du sol.

Selon Lavelle, l'approche des domaines fonctionnels nécessite la caractérisation de l'origine de chaque composant. Ainsi, la porosphère et l'agrégatosphère doivent être associées au régulateur qui les a générés (Lavelle, 2002).

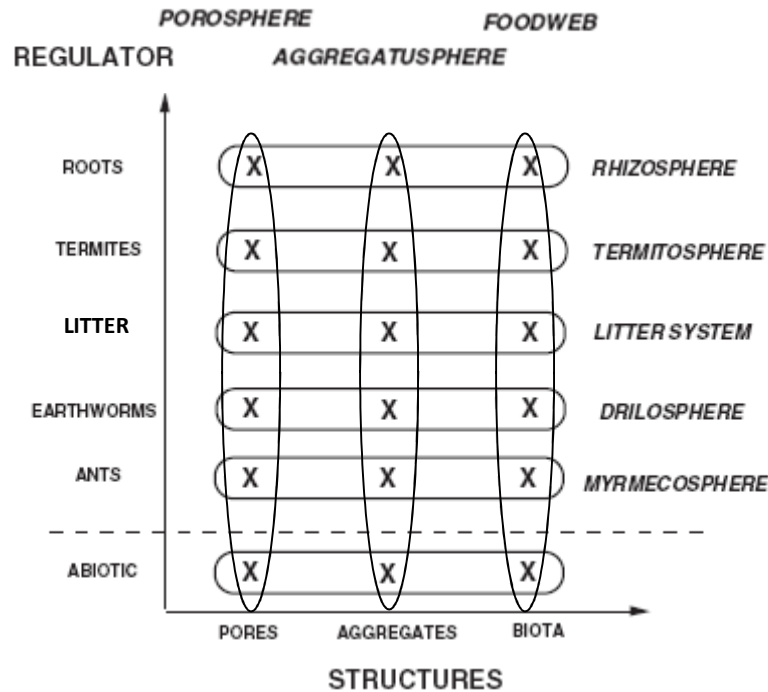


Figure I-11 : Domaines fonctionnels dans le sol définis par un régulateur, les structures qu'ils créent et les organismes vivant dans ces environnements créés (horizontalement). Classification fonctionnelle alternative basée sur les pores, les agrégats et les communautés (verticalement) (d'après Lavelle, 2002).

Les domaines fonctionnels affectent la dynamique de différents processus à différentes échelles d'espace et de temps avec parfois des effets contrastés entre ces échelles (Lavelle, 2002). A travers ces interactions complexes, la diversité à un niveau hiérarchique au sein d'un écosystème peut influencer la diversité structurale et fonctionnelle à d'autres niveaux hiérarchiques. En tant que 'régulateurs' de domaines fonctionnels, les lombriciens participent au maintien de l'hétérogénéité du sol et à la formation de différents micro-habitats via leur action de bioturbation du sol.

3. La bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne

3.1. Le concept de bioturbation

Nous avons pu voir précédemment que les processus supportés par le sol étaient contrôlés par les interactions existant entre les différents organismes y vivant. Ces interactions se concrétisent de différentes manières. Le réarrangement et la translocation physique du sol par la nutrition et le déplacement de certains organismes joue un rôle primordial au sein de

ces interactions. Ce processus qualifié de bioturbation a été étudié pour la première fois par Charles Darwin en 1881 dans son dernier livre « *On the formation of vegetable mounds through the action of worms with observations on their habits* » sans qu'il le nomme (Darwin, 1881). Darwin avait pris conscience de l'importance de ce travail du sol par les organismes vivants et de son rôle dans la formation du sol (Meysman et al., 2006). Il s'était appuyé sur l'observation du travail des vers de terre dans le sol et le rôle de leur activité dans la fertilité du sol et les processus géologiques. Néanmoins, les travaux et les études scientifiques portant sur la bioturbation n'ont vraiment commencé que pendant la deuxième partie du 20^{ème} siècle.

Outre les vers de terre, le phénomène de bioturbation peut être attribué à l'activité d'autres organismes selon l'écosystème auquel on s'intéresse. Ainsi, en milieu aquatique, les polychètes et certains crustacés sont considérés comme 'bioturbateurs' (Meysman et al., 2006). Dans le sol, outre les vers de terre, de nombreux invertébrés génèrent également de la bioturbation comme par exemple, les fourmis et les termites (Lavelle and Spain, 2001). Les mouvements issus de la croissance des racines sont également source de bioturbation. En effet, alors que la racine pénètre dans le sol, celui-ci voit son propre volume déplacé et compressé par le sol alentour. Une zone de vide peut être formée autour de la racine, permettant le passage de l'eau, de nutriments ou de microorganismes (Killham, 1994).

D'un point de vue évolutionniste, le processus de bioturbation serait à l'origine de l'explosion de la vie au Cambrien ('burrowing revolution'). Ainsi, alors que les fonds marins étaient recouverts de tapis bactériens, deux facteurs auraient stimulés cette 'explosion du Cambrien'. Dans un premier temps, l'avènement de la prédation a stimulé le développement protecteur des squelettes extérieurs minéraux (coquilles, épines...) puis le début d'une 'course aux armes' entre les prédateurs et leur proie a commencé. Dans un second temps, les proies ont commencé à utiliser leur squelette extérieur dur comme outils pour creuser dans les sédiments, ce qui leur fournissait un abri contre les prédateurs. Ces derniers ont ainsi développé leur capacité fouisseuse pour retrouver leurs proies (Meysman et al., 2006).

D'un point de vue écologique, les organismes bioturbateurs sont qualifiés d'ingénieurs de l'écosystème et leur présence ou absence a un impact disproportionné sur l'écosystème (Jones et al., 1994). La bioturbation a un effet sur la texture du sédiment, le transport des solutés et la dispersion des particules solides et intervient ainsi dans le fonctionnement et les processus des écosystèmes (Meysman et al., 2006). De part leur activité de bioturbation et leur forte capacité fouisseuse, les lombriciens sont considérés comme ingénieurs des sols (Stork and Eggleton, 1992). Ainsi, dans un sol en présence de lombriciens, la capacité de

rétenction d'eau est plus importante, les agrégats sont plus stables, l'espace poral est plus important et les taux d'infiltration sont augmentés (Anderson, 1988).

3.2. La macrofaune lombricienne

Les lombriciens ou vers de terre (Annélides, Oligochètes) constituent le composant dominant de la faune des sols tempérés. En prairie ils sont au nombre de 600 à 700 individus par m² pour une biomasse supérieure à 1000 kg.ha⁻¹ et dans les agrosystèmes, on retrouve de 300 à 400 individus par m² pour une biomasse moyenne de 500 kg.ha⁻¹ (Binet, 1993; Binet et al., 1997). Darwin a été le premier à attirer l'attention sur les effets bénéfiques des vers de terre dans le sol: "It may be doubted whether there are many others animals which have played so important part in the history of world, as have these lowly organized creatures" (Darwin, 1881).

3.2.1. Ecologie des lombriciens

Les lombriciens ont développé différentes stratégies adaptatives basées sur des caractéristiques morphologiques, comportementales et physiologiques leur permettant de vivre dans le sol. Bouché (1977) les a classés en trois catégories écologiques différentes (Figure I-12):

- Les épigés (Bouché, 1977; Lee, 1985): ils sont de petite taille (10 à 30 mm) et vivent entre les couches de litière ce qui constitue un environnement relativement rude puisqu'ils sont soumis à la sécheresse, aux températures extrêmes, aux facteurs anthropiques et à la prédation. Les épigés contrecarrent cette forte mortalité par une croissance rapide et une fécondité élevée en utilisant de la nourriture de qualité.
- Les anéciques (Bouché, 1977): ils sont de taille moyenne mais certaines espèces peuvent atteindre des tailles géantes (10 à 110 cm). Ils se nourrissent de la litière présente à la surface du sol qu'ils mélangent avec du sol et vivent dans des galeries verticales à sub-verticales qu'ils créent dans le sol. Ces espèces se caractérisent par une forte musculature et une grande activité fouisseuse. Au cours de l'ingestion de sol et de l'enfouissement de la litière organique, les anéciques assurent un mélange intime de la matière organique et de la fraction minérale des différents horizons du sol.

- Les endogés (Bouché, 1977) : ils sont de taille variable (1 à 20 cm) et creusent des galeries d'orientation quelconque dans les horizons superficiels du sol (30 cm). Ces vers sont géophages et se nourrissent de la matière organique incorporée dans le sol. Trois catégories ont été distinguées selon la richesse en matière organique du sol dans lequel ils se nourrissent : les oligohumiques qui vivent dans un environnement avec très peu de ressources nutritives, en profondeur et se déplacent peu, les mésohumiques qui ne sélectionnent pas les particules organiques et vivent entre 10 et 15 cm de profondeur et les polyhumiques qui ingèrent sélectivement les particules organiques en vivant dans la rhizosphère ou à l'interface sol-litière (Lavelle, 1981).

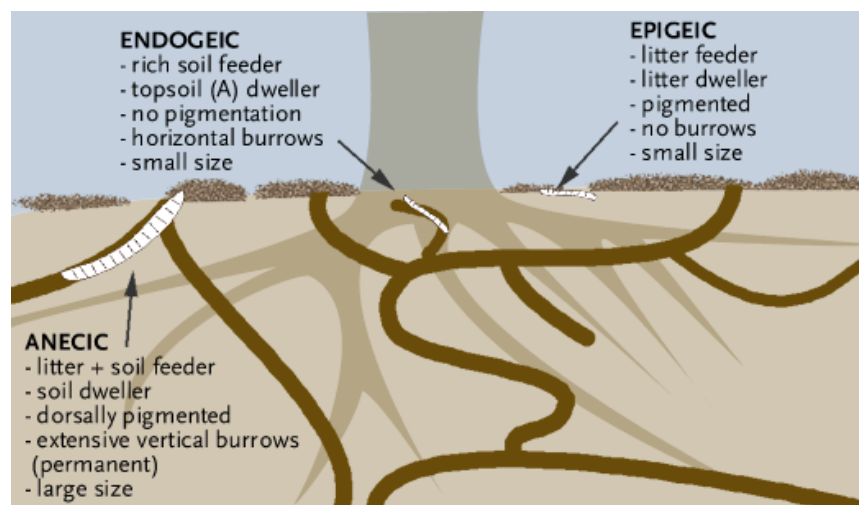


Figure I-12: Catégories écologiques des vers de terre (d'après Bouché, 1977)

Dans ce projet de recherche, l'espèce *Lumbricus terrestris*, un ver de terre anécique, a été utilisée comme organisme modèle de la macrofaune lombricienne du sol et comme bioturbateur de notre système d'étude.

3.2.2. La bioturbation par les lombriciens : modification de la physico-chimie du sol et impact sur les communautés microbiennes

Nous avons pu voir précédemment que la drilosphère constituait un domaine fonctionnel du sol à part entière. Elle est constituée des différents microsites issus de l'activité des lombriciens (galeries et turricules) ainsi que du contenu digestif des vers de terre. Les vers de terre vont ainsi agir directement ou indirectement sur les bactéries du sol.

3.2.2.1. Interaction directe : passage des bactéries dans le tube digestif

Les vers de terre assimilent leurs nutriments et leur énergie avec des efficacités variables selon les espèces et la nature du matériel ingéré. Généralement la stratégie nutritive des lombriciens consiste en une grande consommation et une faible assimilation de matériel de pauvre qualité nutritionnelle (Curry and Schmidt, 2007). Les vers se nourrissent néanmoins sélectivement de matériel riche en matière organique et contenant de grandes concentrations en bactéries (Pedersen and Hendriksen, 1993; Drake and Horn, 2007) mais la qualité nutritionnelle et leur efficacité d'assimilation sont généralement faibles (Curry and Schmidt, 2007). Cette efficacité d'assimilation peut être augmentée par l'activité de la microflore présente dans le système digestif des vers (Lavelle and Spain, 2001) mais il est difficile de savoir quelle proportion d'activité enzymatique (lipase, cellulase, protéase, amylase, chitinase...) est due au ver lui-même et quelle proportion est due à la microflore du sol ingérée. De nombreuses études ont étudié les associations entre les bactéries et le tube digestif des vers en utilisant des techniques de mise en culture ou bien moléculaires. Dans leur ensemble, ces études n'ont pas réussi à identifier des bactéries spécifiquement associées au système digestif des vers concluant que les vers de terre ne possèdent pas de communauté microbiologique intestinale différente de celle du sol dans lequel ils évoluent (Parle, 1963; Fischer et al., 1997; Furlong et al., 2002; Schonholzer et al., 2002; Egert et al., 2004). A l'opposé, Singleton et al. (2003) ont identifié au moins deux groupes bactériens étroitement associés à la paroi intestinale de *Lumbricus rubellus*. De plus, ces phylotypes bactériens associés à l'intestin du ver n'étaient pas les mêmes dans chaque ver examiné confirmant la présence d'une flore bactérienne intestinale chez les lombriciens.

Le tube digestif des lombriciens est anoxique, humide et riche en glucose, formate, acétate, lactate, succinate, nitrite et ammonium (Horn et al., 2003; Drake and Horn, 2007) en faisant un habitat idéal pour les microorganismes réalisant des métabolismes anaérobies et fermentatifs. Ainsi, le tube digestif du ver convient particulièrement aux microorganismes produisant du protoxyde d'azote (N_2O) (Horn et al., 2003; Ihssen et al., 2003), un gaz à effet de serre dont l'émission par les lombriciens peut représenter jusqu'à 30% du N_2O total émis par le sol habité par les vers (Matthies et al., 1999). Les conditions physico-chimiques spécifiques au tube digestif augmenteraient l'activité des microorganismes du sol en stimulant les cellules microbiennes relativement inactives, en activant les cellules viables non cultivables et en favorisant la germination des endospores (Fischer et al., 1997; Drake and Horn, 2007).

3.2.2.2. Interaction indirecte : formation de galeries et de turricules

Pour se déplacer dans le sol, les lombriciens forment des galeries soit en se fauflant par compaction latérale soit en ingérant et en excréant le sol au fur et à mesure de leur progression. Ces réseaux de galeries font de 1420 à 8900 km ha⁻¹ représentant une surface interne de 1.6 à 12 ha ha⁻¹ (Kretzschmar, 1982). Les galeries augmentent la porosité du sol et influencent l'infiltration de l'eau et l'aération. Elles constituent des chemins de circulation préférentielle de l'eau et des solutés (Tomlin et al., 1995; Jegou et al., 2001) ce qui confère aux galeries un statut de 'hot spot' (Bundt et al., 2001). Ces espaces poreux favorisent également la croissance des racines des plantes (Lee, 1985). Les galeries sont plus ou moins tapissées de mucus épidermique et de déjections déposées au cours des passages successifs des vers et peuvent également renfermer des fragments de litière (Binet and Curmi, 1992). Les parois des galeries sont enrichies en azote minéral (nitrate, ammonium) et total ainsi qu'en bactéries transformant l'azote (Binet and Trehen, 1992; Parkin and Berry, 1999; Jegou et al., 2001; Tiunov et al., 2001; Amador et al., 2006). Les teneurs en phosphore sont également supérieures dans les galeries que dans le sol environnant (Tiunov and Scheu, 1999; Le Bayon and Binet, 2006). Enfin, les galeries sont également plus riches en carbone organique et total (Parkin and Berry, 1999; Jegou et al., 2001). Ces différents enrichissements en ressources nutritives font des galeries des habitats privilégiés pour les microorganismes du sol. Il a ainsi été montré que la biomasse et la densité des protozoaires est plus importante dans les parois de galerie que dans le sol environnant (Tiunov et al., 2001).

Après son passage dans le tube digestif, le sol est excrété sous forme de déjections appelées turricules. Ces turricules sont déposés soit à la surface du sol, soit le long des parois de galeries ou dans les galeries (Lee, 1985). En sols tempérés, la production de turricules à la surface du sol a été estimée entre 2 et 250 tonnes ha⁻¹ an⁻¹, elle varie selon les espèces et la taille des vers (Lee, 1985). Suite au passage dans le tube digestif, le sol des turricules diffère du sol environnant d'un point de vue physique, chimique et biologique. Ainsi, les turricules sont généralement enrichis en particules de petite taille, en argile, en matière organique et leur densité est souvent supérieure à celle du sol jouant sur la stabilité des agrégats et l'érosion (Le Bissonnais, 1996; Marashi and Scullion, 2003; Blanchart et al., 2004). Les turricules frais sont également plus humides que le sol (Daniel and Anderson, 1992).

La formation de micro-agrégats stables au sein des turricules a un rôle important dans la protection de carbone dans le sol (Bossuyt et al., 2005) et ces microsites sont ainsi enrichis en carbone organique soluble (Daniel and Anderson, 1992). Le phosphore est également plus

disponible dans les turricules (Le Bayon and Binet, 2006). Parle (1963) a montré que les teneurs en azote total et minéral sont plus importantes dans les turricules que dans le sol environnant et que l'azote minéral initialement majoritairement présent sous forme d'ammonium est rapidement transformé en nitrate lorsque les turricules vieillissent. Globalement les turricules de vers de terre sont enrichis en nutriments et ceux-ci sont plus disponibles que dans le sol environnant.

Haynes et al. (2003) ont montré que la taille des communautés microbiennes au sein des turricules est plus petite que dans le sol environnant mais que celles-ci sont plus actives. Ainsi une augmentation de la respiration microbienne a été observée (Daniel and Anderson, 1992; Binet et al., 1998). En comparant les communautés bactériennes des turricules de celles du sol environnant, plusieurs études ont montré une sélection de différents groupes bactériens dans les microsites de ver. Ainsi les turricules sont enrichis en *Actinobactéries*, *Firmicutes*, γ -*Protéobactéries*, α -*Protéobactéries* et en *Bactéroidètes* (Furlong et al., 2002; Schonholzer et al., 2002; Singleton et al., 2003). Néanmoins les communautés bactériennes présentes dans les turricules sont hautement dépendantes du régime alimentaire du ver (Egert et al., 2004). Cela a également été observé pour les champignons par Tiunov et Scheu (2000b) qui ont montré qu'alors que certaines espèces sont stimulées par le passage dans le système digestif du ver, d'autres sont significativement réduites.

Ces interactions biotiques étroites entre les lombriciens et les microorganismes du sol se situent au cœur du travail de recherche présenté ici. L'intérêt a été porté sur l'effet des vers de terre sur un service écologique rendu par les bactéries du sol, à savoir la dégradation des herbicides limitant ainsi les pollutions.

4. Etude d'un service écosystémique : la biodégradation des herbicides en sols tempérés, cas de l'atrazine

4.1. Adaptation des bactéries du sol à la dégradation des polluants

Suite à une application régulière et/ou en grande concentration de différents polluants, les bactéries du sol ont acquis et/ou développé la capacité de les métaboliser et de les utiliser comme source nutritive dans un milieu où les nutriments sont rares (Macleod and Semple, 2006). Ainsi les bactéries sont capables de minéraliser ces molécules soit via une seule souche soit en s'organisant en consortia bactériens. Cette adaptation des bactéries aux molécules

xénobiotiques se réalise via différents évènements (Spain et al., 1980; Top and Springael, 2003):

- l'induction ou la dérégulation d'enzymes spécifiques qui étaient absentes (ou présentes à un faible niveau) dans la population avant l'exposition au contaminant
- la sélection de nouvelles capacités métaboliques suite à des réarrangements génétiques impliquant des évènements de mutations (van der Meer et al., 1992). Les faibles temps de génération et la forte plasticité de leurs génomes permettent aux bactéries de générer des nouveaux gènes à des fréquences relativement élevées (Arbeli and Fuentes, 2007). Cette plasticité est également liée à des évènements de recombinaison homologue qui sont à l'origine de réarrangements de l'ADN et d'augmentation des contenus génétiques (Dobrindt and Hacker, 2001). Il a par exemple été récemment montré que sous forte pression d'atrazine et après 320 générations, la souche dégradante *Pseudomonas* sp. ADP a augmenté sa capacité de dégradation en dupliquant le gène *atzB* intervenant dans le processus par un évènement de recombinaison homologue utilisant des séquences d'insertion (Devers et al., 2008).
- l'acquisition de cette information génétique par transfert horizontal de gènes (van der Meer et al., 1992; Lipthay et al., 2001). Ainsi, les gènes impliqués dans la dégradation de molécules xénobiotiques sont souvent associés à des éléments de transposition et des séquences d'insertion. Ils sont aussi fréquemment localisés sur des plasmides (Janssen et al., 2005)
- l'augmentation du nombre d'organismes capables de catalyser la ou les réactions impliquées.

Grâce à ces processus d'adaptation, les bactéries les plus aptes à résister ou à dégrader les molécules xénobiotiques vont être sélectionnées et au fur et à mesure vont représenter une plus grande fraction de la population microbienne totale qu'avant la présence du xénobiotique (Top and Springael, 2003).

Les enzymes de dégradation impliquées dans la dégradation des pesticides peuvent posséder une large spécificité rendant possible une 'acclimatation croisée' des bactéries. C'est-à-dire que la dégradation d'une molécule dans un sol peut être due à l'application au préalable d'un autre pesticide appartenant au même groupe chimique (Singh et al., 2005). De plus, la forte homologie (figure I-13) existant entre certains polluants et les métabolites secondaires des plantes (exsudats) qui sont métabolisés par les bactéries du sol semble avoir un rôle important dans le développement d'enzymes dégradant les polluants organiques (Singer et al., 2003).

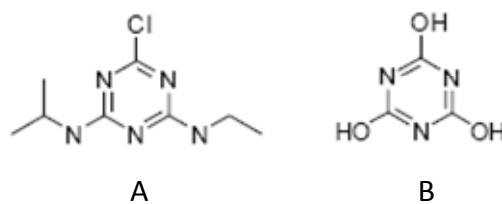


Figure I-13: la molécule d'atrazine (A) dont la structure est analogue à celle de l'acide cyanurique (B), un métabolite secondaire de plante (Singer et al., 2003).

Bien que n'étant plus en contact avec la molécule, les bactéries du sol peuvent conserver la capacité de la dégrader grâce (i) à la formation de spores ou d'autre formes de résistance qui leur permet de survivre pendant de longues périodes dans des conditions non optimales, (ii) aux faibles concentrations de pesticides qui se déssorbent lentement du sol, constituant une source continue de substrat aux bactéries dégradantes, (iii) à la présence d'autres gènes sur le plasmide impliqué dans la dégradation qui sous une autre pression de sélection permet la conservation du plasmide (par exemple, le plasmide portant les gènes de dégradation de l'atrazine chez la souche *Pseudomonas* sp. ADP possède également un gène de résistance au mercure (Martinez et al., 2001)) ou (iv) au fait que les bactéries impliquées se maintiennent à un niveau de population suffisamment important grâce à l'utilisation d'autres sources nutritives (Arbeli and Fuentes, 2007).

Dans le cas des pesticides, l'adaptation des bactéries du sol à la dégradation de ces molécules constitue un problème d'un point de vue économique puisque dans certains cas ces molécules ne se trouvent plus en concentrations suffisantes pour protéger les cultures (Arbeli and Fuentes, 2007). Une plus grande alternance des cultures et donc des traitements phytosanitaires différents constituerait une solution pour limiter cette dégradation accélérée des molécules appliquées due à une adaptation des bactéries du sol. Néanmoins, écologiquement cette capacité épuratrice développée par les bactéries du sol revêt un intérêt majeur en limitant les contaminations et en maintenant la résistance et la résilience du sol. En considérant les niveaux de pollutions actuellement observés dans le sol et l'eau, nous pouvons supposer que sans ce service écosystémique fournit par les communautés bactériennes ces observations seraient encore plus alarmantes.

4.2. Découverte des voies de dégradation de l'atrazine et isollements de bactéries dégradantes

4.2.1. Historique de la découverte des voies de dégradation de l'atrazine

La dégradation de l'atrazine peut être d'origine abiotique. Ces processus incluent des réactions de photodécomposition (Pelizzetti et al., 1990) et des réactions d'oxydation avec des oxydes de métal (Cheney et al., 1998). La dégradation non biologique de l'atrazine en hydroxyatrazine peut également être catalysée par l'argile ou la matière organique du sol (Skipper et al., 1967; Li and Felbeck, 1972). Néanmoins, la dégradation biotique de l'atrazine est la forme la plus importante d'atténuation de ce polluant.

La majorité des processus de dégradation de l'atrazine dans le sol est d'origine biotique et donc réalisée par les organismes vivants. Cette atténuation naturelle de la toxicité de l'atrazine est notamment due à l'adaptation de certaines bactéries du sol qui utilisent l'atrazine comme source de carbone et/ou comme source d'azote. Ces bactéries dégradantes et les voies de dégradation impliquées ont largement été étudiées depuis les années 1970. Ainsi de nombreuses bactéries ont été isolées et différentes voies de dégradation ont été élucidées, impliquant différents gènes fonctionnels.

Alors qu'en 1975 Esser et al. (Esser et al., 1975) montraient que le métabolisme de l'atrazine impliquait des réactions d'hydroxylation, de déalkylation et d'ouverture du cycle (ring cleavage), jusque dans les années 1980, la déchlorination de l'atrazine en hydroxyatrazine (figure I-16), molécule qui n'est plus phytotoxique, était uniquement attribuée à l'hydrolyse chimique de la molécule et non résultant d'une activité microbienne (Behki and Khan, 1986).

En 1982, Giardina et al. (Giardina et al., 1982) mettent en évidence une première voie de biodégradation de l'atrazine par *N*-déalkylation et formation de dééthylatrazine (DEA) et de déisopropylatrazine (DIA) puis de Déisopropyldééthylatrazine (DIEA), réalisée par une souche *Norcardia* isolée du sol. L'ouverture du cycle triazine serait réalisée par une réaction chimique abiotique (figure I-14).

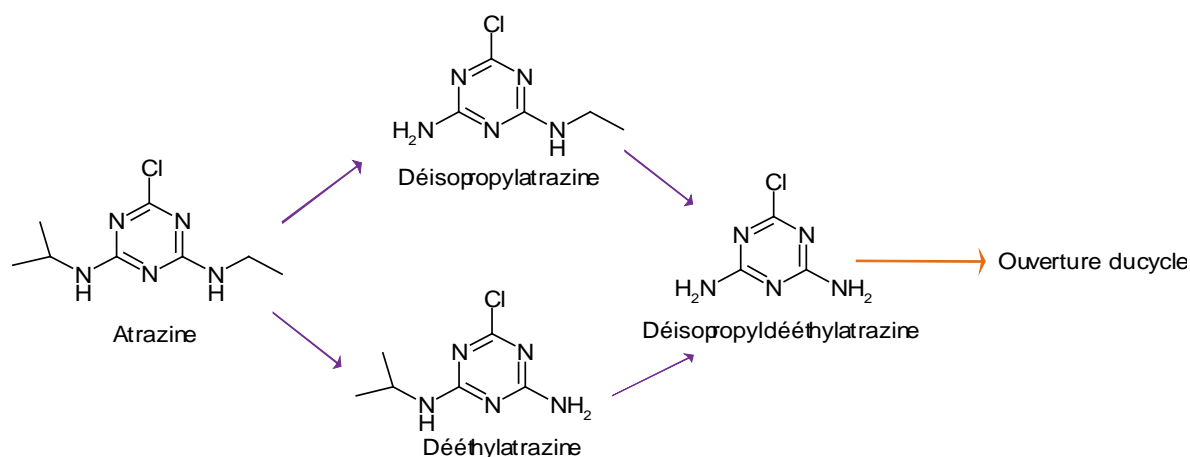


Figure I-14 : Dégradation de l'atrazine par la souche *Nocardia*. Les flèches violettes représentent des réactions biotique et la flèche orange une réaction abiotique (d'après Giardina et al., 1982).

En 1984, alors que la déchlorination de l'atrazine était supposée être abiotique, Cook et Hütter (1984) observent pour la première fois la déchlorination d'un cycle triazine (dééthylsimazine) par une bactérie, *Rhodococcus corallinus* strain 11. Deux ans après, Behki et Khan (1986) isolent des bactéries utilisant l'atrazine comme seule source de carbone et d'énergie à partir d'un sol ayant une longue histoire de traitement à l'atrazine. Trois espèces de *Pseudomonas* sont isolées (*P. putida*, *P. fluorescens* et *P. stutzeri*), montrant l'importance de ce genre dans la dégradation de l'atrazine. La voie de dégradation serait la même que celle réalisée par *Nocardia* (figure I-14) avec une préférence pour la formation de DIA, mais le DIEA serait ensuite déchloré. Les auteurs émettent ainsi l'hypothèse que la déchlorination serait inhibée par la présence des chaînes éthyliques. Behki et Khan (1986) pointent également du doigt le rôle de l'application continue de l'atrazine dans l'adaptation génétique des bactéries du sol car aucune bactérie dégradante n'a été isolée à partir d'un sol sans histoire de traitement avec de l'atrazine. A l'époque, la recherche de plasmides impliqués dans la dégradation de l'atrazine avait été infructueuse.

En 1991, l'ouverture du cycle triazine par voie biotique est identifiée chez trois souches différentes : *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12228, *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227 et *Klebsiella pneumoniae* 99 dégradant différentes molécules de la famille des triazines (Eaton and Karns, 1991a; 1991b). Le gène *trzD* codant pour l'ouverture du cycle est identifié et catalyse la transformation de l'acide cyanurique en biuret (figure I-15). Selon la souche bactérienne, *trzD* se situe sur un fragment d'ADN proche d'un ou de deux autres gènes intervenant dans la dégradation de triazine et ces gènes sont entourés de séquences d'insertion révélant l'importance des échanges génétiques dans l'apparition rapide de nouvelles voies de dégradation des composés xénobiotiques.

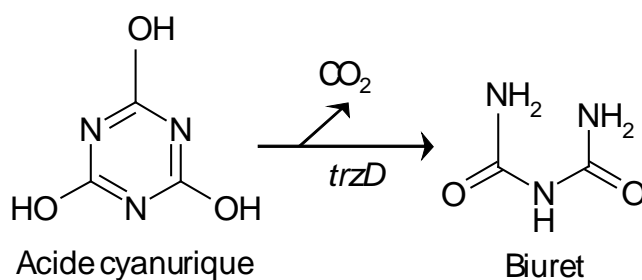


Figure I-15 : ouverture du cycle triazine. Dégradation de l'acide cyanurique en biuret par l'enzyme codée par le gène *trzD*.

En 1993, Mandelbaum et al. (1993) mettent pour la première fois en évidence l'hydroxyatrazine (figure I-16) comme métabolite de l'atrazine dans des cultures sélectivement enrichies à partir de sol en utilisant l'atrazine comme seule source d'azote.

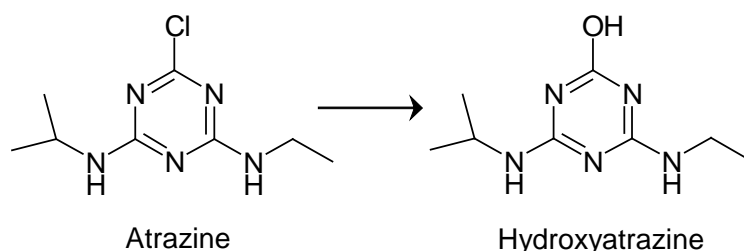


Figure I-16: dégradation de l'atrazine en hydroxyatrazine

En 1995, Nagy et al. (1995a; 1995b) étudient la souche *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 qui dégrade à la fois l'atrazine et le *S*-Ethyl Dipropylcarbamothioate (EPTC) qui est également un herbicide et montrent que la *N*-déalkylation de l'atrazine est réalisée par une monooxygénase à cytochrome P-450 de type II. Ils mettent en évidence les gènes impliqués dans ce système : *thcB* qui code pour l'enzyme cytochrome P-450, *thcC* codant pour la rhodocoxine qui est une ferredoxine et *thcD* qui code pour une ferredoxine reductase. Ces gènes sont sous le contrôle d'une protéine de régulation positive codée par le gène *thcR*. En parallèle de cette découverte, *atrA*, un gène situé sur un plasmide de 77 kb et intervenant dans la *N*-Déalkylation de l'atrazine, a été identifié chez la souche *Rhodococcus* sp. strain TE1 (Shao and Behki, 1995). Mais, après séquençage du fragment d'ADN portant le gène *atrA*, il s'est avéré qu'il s'agissait des gènes *thcR* et *thcB* (Shao and Behki, 1996; Ostrofsky et al., 2002).

Au même moment, Shao et al. (1995) clonent pour la première fois le gène *trzA* responsable de la déchlorination du DEA et du DIA chez *Rhodococcus corallinus* (Mulbry, 1994). Mandelbaum et al. (1995) isolent la souche *Pseudomonas* sp. ADP qui minéralise

l'atrazine et découvre la voie entière de dégradation et les gènes *atzABCDEF* impliqués (de Souza et al., 1995; de Souza et al., 1996; Boundy-Mills et al., 1997; de Souza et al., 1998c; Sadowsky et al., 1998; Martinez et al., 2001) (Figure I-17). L'ensemble de ces gènes est situé sur le plasmide pADP-1 de 110 kb.

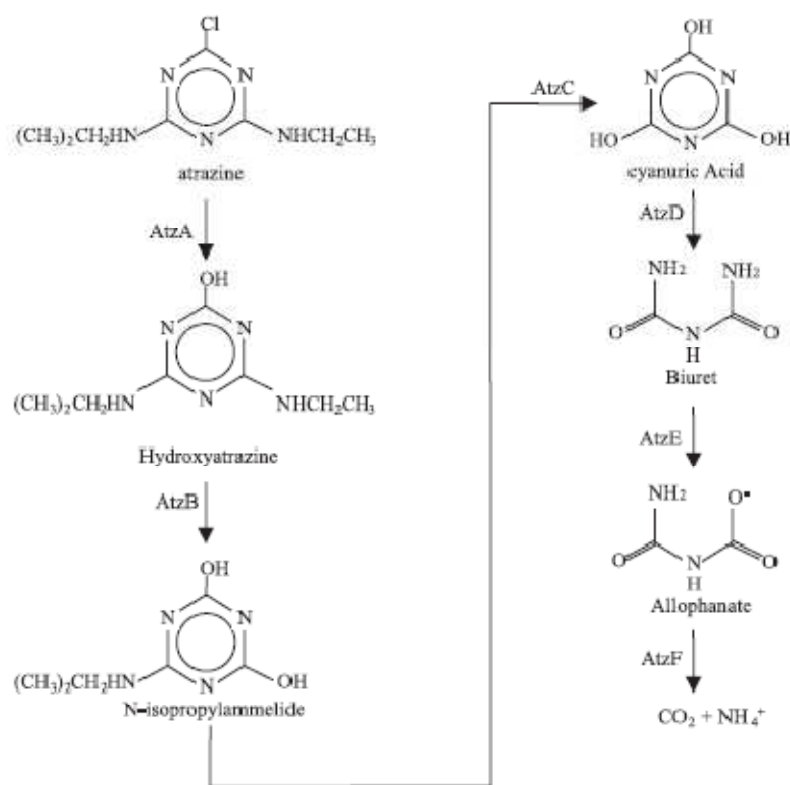


Figure I-17: Voie de minéralisation de *Pseudomonas* sp. ADP. AtzA: atrazine chlorohydrolase; AtzB : hydroxyatrazine hydrolase; AtzC: N-isopropylammelide isopropylamidohydrolase; AtzD: cyanuric acid amidohydrolase; AtzE: biuret hydrolase; AtzF: allophanate hydrolase (Devers et al., 2004).

En 2000, Topp et al. (2000a) isolent la souche *Nocardioide* sp. C190 qui réalise la déchlorination de l'atrazine mais ne possède ni le gène *atzA* ni *trzA*. Un nouveau gène catalysant la formation d'hydroxyatrazine, *trzN* est découvert (Mulbry et al., 2002).

Ainsi, deux types de dégradation de l'atrazine peuvent être réalisés par les bactéries du sol : une dégradation non spécifique et lente associée à la *N*-déalkylation catalysée par une monooxygénase et une dégradation rapide liée à la présence de gènes (*atzA* et *trzN*) qui ont spécifiquement évolué pour le métabolisme de l'atrazine. L'enzyme codée par le gène *atzA* est spécifique aux cycles triazines et au chlore, confirmant une évolution sous pression de sélection pour la déchlorination des herbicides de la famille des *s*-triazines (Seffernick and Wackett, 2001).

4.2.2. Les gènes de dégradation de l'atrazine: apparition et dispersion

Il existe une diversité de gènes intervenant dans la dégradation de l'atrazine impliquant des redondances fonctionnelles. Ainsi trois gènes codant pour la déchloration ont été découverts mais les séquences d'acide aminés correspondantes présentent de faibles pourcentages d'homologie : 41% pour *AtzA* et *TrzA*, 27% pour *AtzA* et *TrzN* et 58% pour *AtzD* et *TrzD* (de Souza et al., 1996; Martinez et al., 2001; Allaby and Woodwark, 2004). Il semblerait que le gène *atzA* ne soit présent que dans les bactéries Gram- alors que *trzN* et *trzA* ont uniquement été détectés dans des bactéries Gram+ à haut contenu en G+C (Ghosh et al., 2008). Les gènes *atzABC* proviendraient d'un même ancêtre commun (gènes paralogues) et seraient apparus récemment (de Souza et al., 1998b; Allaby and Woodwark, 2004). L'atrazine chlorohydrolase codée par *atzA* et la mélamine déaminase codée par *triA* (figure I-18) ont 98% d'identité (9 acides aminés de différence) confirmant une divergence évolutive très récente, la mélamine étant un produit industriel utilisé depuis le début du 20^{ème} siècle (Seffernick et al., 2001; Seffernick and Wackett, 2001; Janssen et al., 2005). Smith et Crowley (2006) ont émis l'hypothèse que *atzB* et *atzC* seraient apparus à partir de mutations des gènes codants pour la dégradation de l'éthylamine et l'isopropylamine, molécules comportant des groupements communs à diverses molécules organiques.

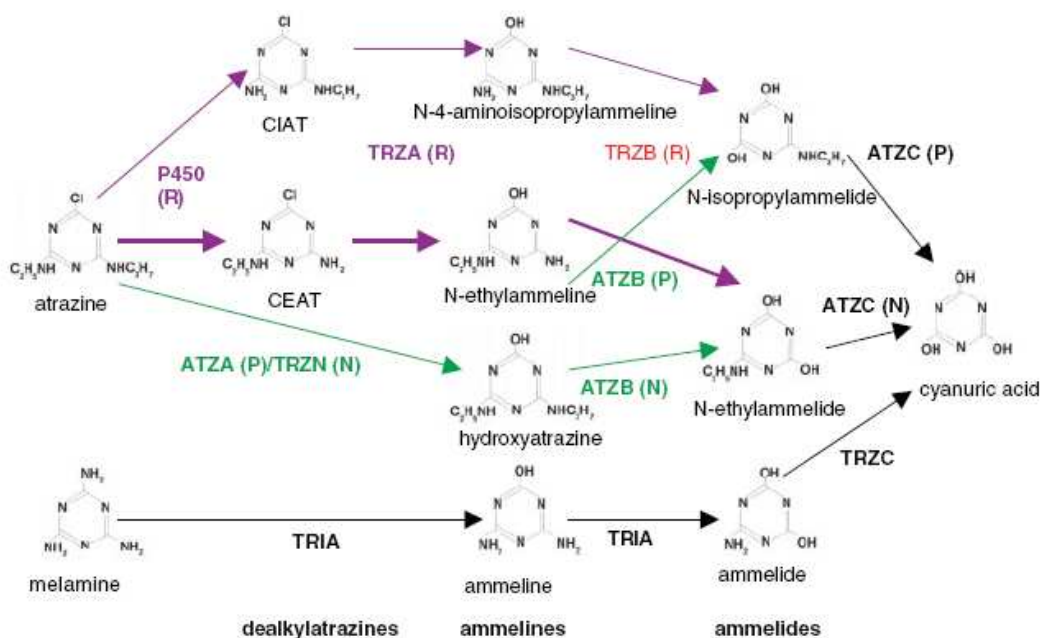


Figure I-18 : voies de dégradation de l'atrazine et de la mélamine (Allaby and Woodwark, 2004). CIAT = DEA, CEAT = DIA

La découverte des gènes *atz* et le séquençage du plasmide les portant constituent une étape importante dans la connaissance des processus permettant l'acquisition de la capacité à dégrader l'atrazine chez les bactéries. Ainsi *atzABC* ont été découverts chez des bactéries de genres différents et isolées à partir de sols géographiquement éloignés (de Souza et al., 1998b). Ces gènes sont donc très répandus et très conservés. Ils se seraient dispersés par transfert horizontal (Devers et al., 2005). La présence des gènes *atz* dans le plasmide pADP-1 serait notamment due à des événements de transposition et recombinaison indépendants (Martinez et al., 2001). La récente découverte du gène *trzN* dans de l'ADN de phage suppose que la transduction peut jouer un rôle dans la dissémination des gènes de dégradation de l'atrazine (Ghosh et al., 2008). Ces gènes de dégradation peuvent néanmoins acquérir une certaine stabilité au sein du génome bactérien puisque le gène *atzA* a été retrouvé dans l'ADN chromosomique de la souche *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai et al., 2003) et plus récemment les gènes *trzN* et *atzBCD* dans l'ADN chromosomique de la souche *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436 (Vaishampayan et al., 2007).

De nombreuses bactéries du sol dégradant l'atrazine ont maintenant été isolées (Tableau I-2) et différentes combinaisons de gènes sont observées (Rousseaux et al., 2001; Rousseaux et al., 2002). Ces combinaisons peuvent être plus ou moins efficaces dans la dégradation. Parmi les bactéries dégradantes isolées jusqu'à maintenant, la souche *Arthrobacter aureescens* TC1 (Strong et al., 2000) qui possède les gènes *trzN*, *atzB* et *atzC* est la plus efficace (Shapir et al., 2007). Ses gènes de dégradation sont portés par le plasmide pTC1 qui a été séquençé, il possède 6 copies de *trzN* ce qui doit augmenter le niveau d'expression de TrzN et être à l'origine de la grande efficacité de la souche. De plus ce grand nombre de copies du gène *trzN* fournit un avantage compétitif à *A. aureescens* TC1 par rapport à des souches telles que *Pseudomonas* sp. ADP qui ne possèdent qu'une seule copie de *atzA* pouvant être ainsi plus facilement perdu dans des conditions de croissance sans pression de sélection adéquate (Mongodin et al., 2006). Alors que le gène *atzA* agit sur une gamme de substrat très restreinte, *trzN* possède un spectre d'action plus large, lui conférant un autre avantage qui pourrait être à l'origine d'une plus grande dispersion dans l'environnement (Seffernick and Wackett, 2001; Shapir et al., 2005; Shapir et al., 2007). Les amidohydrolases codées par les gènes *atzB* et *atzC* agissent également sur différentes molécules s-triazine et particulièrement AtzB qui catalyse à la fois des réactions de déamination et de déchloration (Shapir et al., 2002; Seffernick et al., 2007).

Tableau I-2 : souches bactériennes dégradant l'atrazine isolées de sols

souche	gènes	métabolites finaux	référence
<i>Rhodococcus</i> sp. TE1	cytochrome P-450	DEA, DIA	Behki et al., 1993
<i>Pseudomonas</i> sp. strain YAYA6		CO ₂ + NH ₂ , acide cyanurique	Yanze-Kontchou et Gschwind, 1994
<i>Rhodococcus</i> sp. NI86/21	cytochrome P-450	DEA, DIA	Nagy et al. 1995
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	<i>atzABCDEF</i>	CO ₂ + NH ₂	Mandelbaum et al. 1995
<i>Ralstonia basilensis</i> M91-3		CO ₂ + NH ₂	Radosevich et al. 1995
<i>Clavibacter michiganense</i> ATZ1, <i>Pseudomonas</i> sp. strain CN1	consortium, <i>atzABC</i>	CO ₂ + NH ₂	Alvey and Crowley, 1996
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14a		CO ₂ + NH ₂	Struthers et al. 1998
<i>Nocardioides</i> C190	<i>trzN</i>	N-ethylammelide	Topp et al. 2000
<i>Pseudaminobacter</i> sp. C147	<i>atzABC</i>	CO ₂ + NH ₂	Topp et al. 2000
<i>Chelatobacter heintzii</i> strain Cit1	<i>atzABC</i> , <i>trzD</i>	CO ₂ + NH ₂	Rousseaux et al. 2001
<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	<i>trzN</i> , <i>atzBC</i>	acide cyanurique	Sajjaphan et al. 2004
<i>Nocardioides</i> sp. SP12	<i>trzN</i> , <i>atzBC</i>	acide cyanurique	Piutti et al. 2003
<i>Arthrobacter</i> sp. strain MCM B-436	<i>trzN</i> , <i>atzBCD</i>	CO ₂ + NH ₂	Vaishampayan et al. 2007

L'isolement de consortia dégradants permet d'appréhender la complexité des processus de dégradation de l'atrazine dans le sol. Il a été montré que jusqu'à 8 bactéries différentes pouvaient intervenir dans le processus de dégradation de l'atrazine (de Souza et al., 1998a; Smith et al., 2005; Chirnside et al., 2007; Kolic et al., 2007). Alors que certaines étapes de la dégradation peuvent être fonctionnellement redondantes parmi les bactéries de la communauté dégradante, d'autres sont spécifiques à un microorganisme que l'on pourra qualifier de clé dans le processus (Smith et al., 2005). Plusieurs voies de dégradation peuvent être utilisées simultanément et la dégradation est généralement plus rapide que lorsqu'elle est réalisée par une seule bactérie grâce aux interactions synergiques entre chaque bactérie membre (Smith et al., 2005).

L'ensemble de ces connaissances ouvre la possibilité d'utiliser ces bactéries et/ou leurs gènes dans des objectifs de bioremédiation de sols contaminés (bioaugmentation). Strong et al. (2000) ont par exemple utilisé une souche d'*Escherichia coli* recombinante possédant le gène *atzA* sur un sol accidentellement contaminé à l'atrazine et ont observé une réduction de 77% des concentrations d'atrazine en 8 semaines. Une autre alternative consiste à stimuler des bactéries dégradant l'atrazine initialement présentes dans le sol en apportant les nutriments appropriés (biostimulation) (Wackett et al., 2002). Enfin, l'utilisation combinée de la bioaugmentation et de la biostimulation semble être le traitement le plus efficace (Strong et al., 2000).

5. Les outils moléculaires en écologie fonctionnelle : de la diversité aux fonctions des bactéries

Grâce au développement de la biologie moléculaire, les connaissances sur la diversité des bactéries du sol, leur activité et leurs fonctions se sont multipliées. Alors que seul 1% de l'ensemble de cette diversité a été cultivée et caractérisée (Torsvik and Ovreas,

2002) et qu'au maximum 10% des microorganismes sont cultivables (Torsvik et al., 1998), ces nouveaux outils basés sur l'étude des acides nucléiques ont permis d'appréhender l'importance de ces microorganismes du sol dans les processus supportés par cet écosystème (figure I-19).

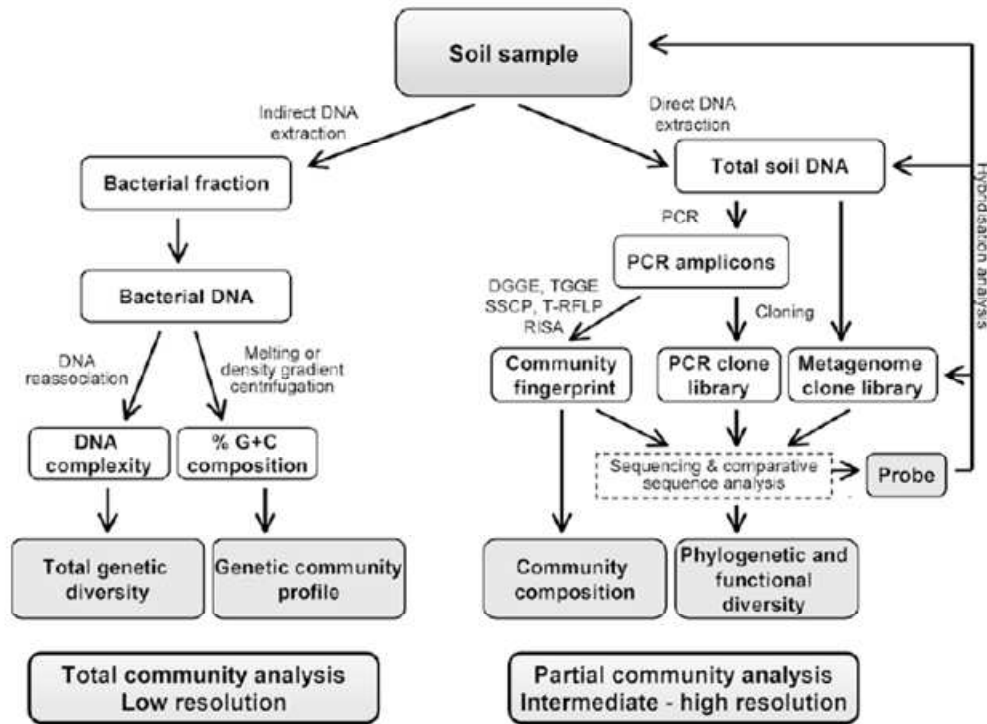


Figure I-19 : techniques moléculaires utilisées communément en écologie microbienne (Lynch et al., 2004)

5.1. La diversité des bactéries du sol

La diversité des bactéries du sol peut être estimée à différents niveaux de résolution selon les outils et les techniques utilisées. Ainsi, une estimation grossière et à large échelle de la diversité bactérienne peut être obtenue en étudiant la composition en base nucléotidiques exprimée sous la forme d'un pourcentage molaire en guanine et cytosine (% G + C) déterminé par l'analyse des points de fusion des ADNs et les vitesses de réassociation d'ADNs simples brin dénaturés (Torsvik et al., 1998). Cette technique donne une estimation de la complexité génétique totale des bactéries présentes (diversité globale) et permet de comparer différents échantillons d'ADN environnementaux. Néanmoins elle ne permet ni de détecter des petites différences entre échantillons, ni d'identifier les bactéries présentes.

L'apparition de la technique de polymérisation en chaîne (PCR) (Mullis et al., 1986) permet le développement de techniques moléculaires de plus haute résolution qui donnent accès à la détection des bactéries à l'échelle de l'espèce (Nannipieri et al., 2003). Ainsi dans

les 30 dernières années, les techniques ciblant les gènes codant l'ARN ribosomique (ARNr) et plus spécifiquement l'analyse du gène codant pour la petite sous unité d'ARNr 16S ont révolutionné la systématique des procaryotes. Du au rôle fondamental des ribosomes dans la synthèse protéique, ces gènes sont très conservés et sont partagés par l'ensemble des organismes vivants. Les ARNr sont des molécules qui se sont formées très tôt dans l'histoire évolutive, elles n'ont pas été affectées par les changements de l'environnement dans lequel se trouve l'organisme et leurs fonctions sont universelles et constantes. Les données mutationnelles pour les gènes codant les ARNr sont de très bonne qualité phylogénétique avec des phénomènes d'homoplasie (similitudes non héritées) moins fréquents que pour de nombreux autres gènes. Ainsi et parce que les ARNr contiennent une quantité considérable d'information génétique et ne sont pas transmis par transfert de gène horizontal, ils sont utilisés comme base moléculaire pour la reconstruction phylogénétique (Rossello-Mora and Amann, 2001).

Parmi les techniques utilisant les séquences du gène codant l'ARNr 16S, la DGGE et la TGGE (Gel d'électrophorèse en gradient de dénaturation et de température) possèdent des niveaux de résolution intermédiaires (Muyzer et al., 1993). Ces techniques permettent de séparer des fragments d'ADNr 16S amplifiés par PCR selon leur point de fusion par migration sur gel de polyacrylamide en présence d'un gradient de dénaturation chimique ou par une augmentation de température. Cette technique est simple, rapide et peu coûteuse et présente l'avantage de pouvoir étudier les bandes d'intérêt par hybridation avec des sondes spécifiques ou extraction puis séquençage (Muyzer and Smalla, 1998). Néanmoins, il existe des biais liés à la PCR. Ainsi, l'amplification peut être inhibée par des contaminants, elle peut être sélective ou encore elle peut former des molécules d'ADN chimériques (Nannipieri et al., 2003). Les autres limites liées à la technique en elle-même sont que la DGGE et la TGGE ne révèlent que les populations dominantes, qu'une bande ne correspond pas forcément à une espèce car des fragments d'ADN de séquences différentes peuvent avoir la même mobilité sur gel de polyacrylamide et enfin, qu'une espèce bactérienne peut également être à l'origine de plusieurs bandes (Gelsomino et al., 1999).

La RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) est une technique se basant également sur le polymorphisme du gène codant l'ARNr 16S pour l'étude de la diversité. Elle consiste à digérer les fragments d'ADN amplifiés par PCR avec des enzymes de restriction. Les fragments sont ensuite séparés sur gel d'agarose ou gel de polyacrylamide (Liu et al., 1997). Cette technique est utile pour détecter des changements de structure des communautés

microbiennes mais ne peut mesurer la diversité ou détecter des groupes phylogénétiques spécifiques (Liu et al., 1997; Kirk et al., 2004).

La T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) consiste à digérer par des enzymes de restriction des produits d'amplification provenant d'une PCR utilisant des amorces marquée par des fluorochromes. Cela permet la détection spécifique et très fine des fragments terminaux de restriction (T-RFs) (Liu et al., 1997) et l'analyse de communautés complexes. Ainsi cette technique fournit une information sur la diversité car chaque T-RF détecté correspond dans l'idéal à une unité taxonomique opérationnelle (OTU) (Tiedje et al., 1999). Cette technique permet de déterminer la richesse spécifique et la distribution des communautés ainsi que les similarités entre échantillons (Liu et al., 1997). Elle est reproductible et robuste (Osborn et al., 2000). De plus, son automatisation permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Outre les biais liés à la PCR, on ne peut négliger le biais associé à la digestion enzymatique. Pour augmenter la résolution de l'outil, il convient de choisir judicieusement différentes enzymes de restriction qui génèrent des signatures de diversité différentes pour un même échantillon biologique (Dunbar et al., 2000). Pour éviter de surestimer la diversité par la présence de produits d'amplification partiellement digérés (Osborn et al., 2000), la réalisation de réplicats vrais est indispensable (Vandenkoornhuys et al., 2003). Une limite de la technique de T-RFLP est la difficulté voire l'impossibilité de relier un T-RF à une espèce (Anderson and Cairney, 2004). Néanmoins, la T-RFLP a un niveau de résolution équivalent ou supérieur à ceux de la DGGE et de la TGGE (Clement et al., 1998), c'est une technique puissante et reproductible qui a été utilisée pour mesurer des changements spatiaux et temporels de communautés bactériennes (Lukow et al., 2000), pour étudier la structure des communautés bactériennes dans la rhizosphère (Blackwood and Paul, 2003) ou encore pour comparer des communautés de champignons mycorhiziens (Vandenkoornhuys et al., 2003).

Outre le gène codant l'ARNr 16S, l'espaceur intergénique (IGS) localisé entre les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S est également utilisé pour étudier la diversité et la structure des communautés bactériennes. Cette région présente la particularité d'un polymorphisme de taille très important permettant de différencier des espèces ou des groupes bactériens (Kirk et al., 2004). Cette technique appelée RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) consiste à amplifier l'IGS par PCR, les produits obtenus sont séparés sur un gel de polyacrylamide et les bandes obtenues peuvent ensuite être séquencées mais les analyses phylogénétiques sont limitées par le faible nombre de séquences disponibles dans les bases de données. Néanmoins la RISA est une technique hautement reproductible et a été utilisée pour

étudier la structure des communautés bactériennes du sol dégradant l'atrazine (Martin-Laurent et al., 2004), pour comparer la diversité microbienne dans le sol (Borneman and Triplett, 1997a) ou encore dans des sols contaminés (Ranjard et al., 2000).

Tableau I-3 : Avantages et limites des techniques d'étude de la diversité des communautés bactériennes (d'après Kirk et al., 2004).

Méthode	Avantages	Inconvénients
G+C	Pas de biais liés à la PCR Inclue tous les ADN extraits Quantitatif Inclue les membres 'rares' de la communauté	Nécessite de grandes quantités d'ADN Dépend des efficacités de lyse et d'extraction Niveau de résolution grossier
Hybridation et réassociation des acides nucléiques	ADN total extrait Pas de biais liés à la PCR Etude de l'ADN et de l'ARN Peut être étudié <i>in situ</i>	Manque de sensibilité Les séquences doivent être en grand nombre de copies pour être détectées Dépend des efficacités de lyse et d'extraction
DGGE et TGGE	Un grand nombre d'échantillons peut être analysé simultanément Fiable, reproductible et rapide	Biais liés à la PCR Dépend des efficacités de lyse et d'extraction La conservation des échantillons peut modifier les communautés Une bande peut représenter plus d'une seule espèce Ne détecte que les espèces dominantes
ARDRA ou RFLP	Détecte les changements structuraux des communautés microbiennes	Biais liés à la PCR Les profils de bandes sont souvent trop complexes
T-RFLP	Profils de bandes plus simple qu'avec la RFLP Automatisable, traitement d'un grand nombre d'échantillons Très reproductible Compare des différences entre des communautés microbiennes	Dépend des efficacités de lyse et d'extraction Biais liés à la PCR Le type de Taq peut augmenter la variabilité Choix des amorces universelles Choix des enzymes de restriction
RISA	Très reproductible Profils de communauté Automatisable (ARISA)	Nécessite de grandes quantités d'ADN Faible résolution Biais liés à la PCR

Toutes ces techniques permettent d'accéder à la composition des communautés d'une façon plus ou moins robuste mais aucune ne permet de relier la diversité à la fonction.

5.2. Fonctions et activités des bactéries du sol

Les techniques de biologie moléculaire permettent également l'étude de gènes fonctionnels en dessinant des amorces ciblant leur amplification spécifique et les produits de PCR peuvent être analysés par les techniques présentées précédemment (Prosser, 2002). Néanmoins les gènes fonctionnels étudiés doivent être choisis avec soin car tous ne sont pas de bons candidats pour réaliser ces analyses (trop ou pas assez de diversité entre les séquences par exemple). Braker et al. (2001) ont par exemple déterminé la structure des communautés dénitrifiantes dans des sédiments marins en réalisant une analyse T-RFLP du produit d'amplification du gène *nirS* codant pour la nitrate réductase. La comparaison des phylogénies obtenues à partir du gène codant l'ARNr 16S et celles de gènes fonctionnels issus d'un même échantillon montre que la fonction n'est pas toujours fiable aux groupes phylogénétiques. Cela peut être interprété par l'occurrence de transferts horizontaux des gènes fonctionnels et aussi par le fait qu'ils peuvent être portés par des plasmides (Prosser, 2002).

Initialement appliquée au gène codant l'ARNr 16S, les puces à ADN constituent un outil rapide et spécifique pour la détection de gènes fonctionnels présents dans un échantillon environnemental. Des centaines de gènes fonctionnels peuvent ainsi être recherchés simultanément (Kelly, 2003; Kirk et al., 2004). Les puces à ADN ont par exemple été utilisées pour détecter des gènes impliqués dans le cycle de l'azote dans plusieurs sédiments. Selon les propriétés physico-chimiques des échantillons, des profils d'hybridation différents ont été obtenus impliquant des communautés bactériennes dénitrifiantes et nitrifiantes différentes (Taroncher-Oldenburg et al., 2003).

La quantification des gènes fonctionnels présents dans le sol apporte une information importante sur la taille des groupes fonctionnels impliqués dans différents processus. Différentes techniques de quantification existent dont la PCR compétitive et la PCR en temps réel (ou qPCR). La PCR compétitive est basée sur l'ajout d'un fragment d'ADN compétiteur dans l'échantillon lors de la réalisation de la PCR. Ce compétiteur est ajouté en quantité connue et doit pouvoir être amplifié avec les mêmes amorces que l'ADN cible mais il doit être distinguable (par sa taille, son profil de restriction...). Ainsi, lors de la PCR, il y a une compétition d'amplification entre le compétiteur et l'ADN cible, et plus la quantité de compétiteur est importante par rapport à l'ADN cible, moins l'ADN cible sera amplifié. Ainsi la quantité d'ADN cible peut être déterminée par comparaison avec la concentration de l'ADN compétiteur. Cette technique est précise mais les amorces peuvent ne pas avoir la même affinité pour l'ADN cible et l'ADN compétiteur (Sharma et al., 2007). Le principe de la PCR en temps réel est quant à lui basé sur la détection d'un signal de fluorescence émis suite à la synthèse des amplicons par l'ADN polymérase. La quantité d'ADN présente dans la réaction peut être suivie à tout instant pendant la PCR. Le principe consiste à placer des sondes fluorescentes dans le mélange réactionnel. Ces sondes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) soit sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon) et ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Le nombre de cycle de PCR (appelé Ct pour Cycle Threshold) correspondant à l'instant où la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser un seuil de fluorescence fixé est à la base des calculs pour quantifier l'ADN. La quantification absolue de l'ADN nécessite l'utilisation de standards correspondants au gène d'intérêt cloné dans un vecteur et utilisé en dilution sériées comme référence. Les limites de la qPCR sont principalement liées à l'utilisation d'appareillages spécifiques (thermocycleur, programme informatique, amorces) et au fait que les amplicons doivent être de taille limitée. De plus l'utilisation du SYBR green implique une détection non spécifique.

Néanmoins, la qPCR présente de nombreux avantages tels que sa reproductibilité, sa précision, son utilisation en haut débit, sa faible limite de détection... (Sharma et al., 2007).

Alors que les techniques de mesure de l'activité microbienne dans les sols étaient principalement basée sur des mesures de respiration (basale ou induite), de minéralisation de l'azote ou encore de contenu en ATP, l'utilisation des techniques moléculaires peut augmenter la précision de détermination de cette activité (Nannipieri et al., 2003). L'ARN peut ainsi être utilisé comme indicateur de l'activité des bactéries dont l'étude a franchi un grand pas avec le développement de protocoles d'extraction d'ARN de sol efficaces. En effet, plus un organisme est actif et croît rapidement, plus il possède de ribosomes et donc d'ARNr 16S s'il s'agit de bactéries. Ainsi en comparant des profils de communautés bactériennes de sol (DGGE par exemple) obtenus à partir d'ADN ou d'ARN extrait d'un même échantillon il est possible de distinguer les populations actives et inactives et de déterminer quels membres de la communauté deviennent actifs sous des conditions particulières. De plus la détection de ARNm d'un gène particulier peut être utilisée afin d'évaluer l'expression de ce gène et de déterminer la réponse d'une fonction précise suite à des changements des conditions environnementales (Griffiths et al., 2000; Hurt et al., 2001; Prosser, 2002). Une fois extrait du sol, l'ARN peut également être utilisé pour quantifier l'expression des gènes en utilisant des techniques telles que les puces dédiées à l'analyse de transcrits, une PCR quantitative couplée à une transcription reverse ou encore une RT-PCR compétitive (Saleh-Lakha et al., 2005; Leininger et al., 2006; Nicolaisen et al., 2008). Ici encore ces approches ne permettent que d'établir un lien indirect entre la diversité des taxons et les fonctions qu'ils supportent.

5.3. Un nouvel objectif : relier la diversité aux fonctions du sol

De nouvelles approches basées sur le séquençage des génomes entiers de l'ensemble des communautés bactériennes dans un environnement (métagénome) sont en plein développement. L'analyse combinée des gènes codant l'ARNr et des gènes fonctionnels apporterait à la fois des informations sur la diversité phylogénétique et la diversité fonctionnelle potentielle des communautés bactériennes (Rondon et al., 2000). La métagénomique est basée sur l'extraction d'ADN à partir d'un échantillon environnemental puis sur l'analyse des séquences et des génomes présents. La construction de banques métagénomiques permet de sélectionner les clones pour leur expression d'une fonction spécifique telles qu'une activité enzymatique ou une production d'antibiotique (Handelsman, 2004). Des études de métagénomes ont révélé l'ampleur de la biodiversité dans une large

gamme d'environnements ainsi que des nouvelles fonctions portées par les communautés (Dupre and O'Malley, 2007). Ainsi, des banques métagénomiques réalisées à partir de sol ont permis d'isoler des gènes codant pour de nouvelles fonctions enzymatiques (Courtois et al., 2003) ou encore d'appréhender la diversité des bactéries, archaea, champignons et virus dans le sol (Fierer et al., 2007).

Les approches de métagénomique apportent de nouvelles connaissances sur l'ensemble de la diversité et des fonctions présentes dans un milieu donné, ces approches permettent de prédire les fonctions exercées par les différents acteurs d'un milieu et de relier diversité et fonction (Allen and Banfield, 2005; Mou et al., 2008). Cette relation revêt un intérêt fondamental en écologie pour une meilleure compréhension du fonctionnement écosystémique et l'utilisation des isotopes stables pour le marquage des acides nucléiques permet de révéler expérimentalement et de manière directe le lien entre l'acteur et la fonction et de répondre précisément à la question 'qui fait quoi?'. Des travaux datant de 1958 et étudiant la réplication de l'ADN ont montré qu'après marquage avec du ^{15}N , les ADN marqués pouvaient être séparés des ADN des cellules filles moins marqués grâce à un gradient de centrifugation établi dans du chlorure de césium (Meselson and Stahl, 1958). En se basant sur ces travaux, la technique de 'stable isotope probing' (SIP) a été développée (Radajewski et al., 2000). Elle consiste à apporter un substrat marqué avec un isotope stable (^{15}N , ^{13}C ou ^{18}O) à un échantillon environnemental. Au fur et à mesure de la consommation du substrat, les acides nucléiques des microorganismes impliqués dans le processus vont incorporer l'isotope stable. Après extraction, ces acides nucléiques vont pouvoir être séparés par ultracentrifugation en fonction de leur masse moléculaire et donc de l'incorporation ou non de l'isotope stable. Par cette stratégie il est possible d'accéder à la diversité des microorganismes impliqués dans la dégradation du substrat en séquençant les gènes codant l'ARNr présents dans la fraction lourde du gradient. Les premiers résultats obtenus correspondaient à des substrats carbonés simples tels que le méthanol ou le méthane (Radajewski et al., 2000; Morris et al., 2002) puis la technique a été appliquée à des substrats plus complexes comme le phénol, le salicylate, le naphthalène, le phenanthrène ou encore le 2,4-D (Manefield et al., 2002; Singleton et al., 2005; Cupples and Sims, 2007). Initialement utilisé avec l'ADN, le SIP est maintenant utilisé sur l'ARN qui représente un meilleur marqueur car il est synthétisé plus rapidement et en quantités plus importantes que l'ADN, sa synthèse n'est pas dépendante de la réplication des bactéries et il est caractéristique des bactéries actives (Manefield et al., 2002). Le SIP-ARN a ainsi été utilisé pour identifier les bactéries et archaea impliquées dans la dégradation du propionate dans un système sol-

anaérobie (Lueders et al., 2004) ou encore pour étudier les interactions étroites existant entre les champignons mycorhiziens et les racines des plantes (Vandenkoornhuyse et al., 2007). La technique de SIP-ARN permet donc de révéler très finement la diversité fonctionnelle, et de la relier à la composition de la communauté toute entière. De plus, cette technique peut être associée à des analyses métagénomiques pour la détection de nouveaux gènes impliqués dans la dégradation du substrat étudié (Dumont et al., 2006).

6. Objectifs du travail de recherche

Considérant les différents éléments énoncés ci-dessus, les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectif de mieux comprendre les interactions étroites existant entre la macrofaune lombricienne et les bactéries du sol. Nous nous sommes placés dans un contexte de pollution des sols par les herbicides en s'appuyant sur un service écologique rendu par cet écosystème: la dégradation d'un polluant modèle, l'atrazine. Cette molécule présente différents intérêts : les bactéries du sol sont adaptées à sa dégradation, les connaissances sur sa dégradation sont étendues apportant une quantité d'informations utile à nos travaux et il s'agit toujours d'un des polluants majeurs actuel des eaux souterraines et de surface que ce soit en France, où son utilisation a pourtant été interdite en 2003, ou sur le continent Américain.

Ce travail de recherche a reçu le soutien du Conseil Régional de Bretagne par l'attribution d'une bourse doctorale régionale sur le projet POLLUSOL et via le plan état-région CPER intitulé 'Transferts des matières en suspension et des polluants associés (métaux lourds, phosphore, pesticides). Ces travaux s'inscrivent également dans un programme de recherche national EC2CO intitulé 'Approche génomique de l'action et réponse des communautés bactériennes, en relation avec la bioturbation, dans l'écodynamique des polluants organiques (herbicides) en sols tempérés' associant 4 laboratoires (UMR CNRS 6553 ECOBIO à Rennes, UMR CNRS 5005 AMPERE à Lyon, UMR INRA 1229 à Dijon et l'Ecole Nationale de la Santé Publique (ENSP) à Rennes). Ce projet comportait trois objectifs majeurs : identifier la diversité de la fraction des bactéries du sol effectivement impliquée dans la dégradation de l'atrazine, examiner si certains gènes d'intérêt pour la dégradation s'expriment différemment dans les microsites de sol proximaux mais spatialement indépendant générés par la bioturbation et argumenter si la bioturbation du sol a une signification écologique particulière dans les transferts horizontaux de gènes entre bactéries du sol. Mon travail de thèse s'est intégré dans les deux premiers objectifs de ce projet EC2CO.

Les interactions biotiques entre la macrofaune lombricienne et les bactéries dégradant l'atrazine ont été peu étudiées jusqu'à présent et la plupart des études s'appuient sur une interaction indirecte liée à une modification de la disponibilité et de la rétention de la molécule suite à l'action des vers de terre dans le sol (Edwards et al., 1993; Sigua et al., 1995; Meharg, 1996; Farenhorst et al., 2000b; Farenhorst et al., 2000a; Gevaio et al., 2001; Alekseeva et al., 2006). A notre connaissance, seule l'étude de Kersante et al. (2006) propose

des résultats sur l'action des lombriciens sur les communautés bactériennes dégradantes, montrant une diminution du potentiel génétique dégradant dans les microsites générés par la bioturbation du sol par *L. terrestris*.

La réalisation de ce travail de recherche a nécessité un développement méthodologique important et les principales étapes de mise au point ainsi que les détails méthodologiques sont présentés dans le chapitre II, matériels et méthodes.

Les deux chapitres suivants présentent les résultats des travaux expérimentaux réalisés durant cette thèse et traitent de l'impact de la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne sur les communautés bactériennes dégradant l'atrazine. Les différentes analyses ont été réalisées sur des microsites de sols issus de l'activité des vers de terre (paroi de galerie, turricules, contenus digestifs).

Dans le chapitre III, nous nous sommes intéressés à l'impact de la bioturbation sur le nombre et l'activité des bactéries indigènes et celles dégradant l'atrazine dans le sol. Ainsi dans un premier temps le gène codant l'ARNr 16S et le gène *atzA* intervenant dans la dégradation de l'atrazine ont été quantifiés par qPCR en parallèle de la mesure de la minéralisation de l'atrazine en présence ou non de la souche *Pseudomonas* sp ADP ou de *Chelatobacter heintzii*. Afin d'apporter des compléments d'interprétation, une seconde étude a été réalisée cette fois-ci en quantifiant le ARNr 16S et l'expression des gènes *atzA* et *atzD* par RT-qPCR dans deux sols aux capacités dégradantes différentes. Nous testons l'hypothèse que les lombriciens modifient l'abondance et l'activité des bactéries dégradant l'atrazine dans les microsites de sol générés par leur action de bioturbation.

Complémentaires à ceux du chapitre III, les objectifs des travaux présentés dans le chapitre IV étaient d'identifier les bactéries activement impliquées dans la dégradation de l'atrazine en utilisant la technique de SIP-ARN. Dans un premier temps, une phase de mise au point de la technique a été réalisée dans des conditions optimales. Outre le côté développement de protocole, une question scientifique a été posée derrière ce travail : l'ajout de différents substrats carbonés simples va-t-il générer des réponses différentes des bactéries vivantes du sol et ces réponses dépendent-elle de l'état d'activité du microsite étudié ('hot spot' ou non). Dans un second temps, la technique de SIP-ARN a été appliquée à l'atrazine et les bactéries activement impliquées dans cette dégradation ont été identifiées à différents temps et dans différents microsites de sol issus de la bioturbation par les lombriciens afin d'observer un impact de la bioturbation sur la composition des communautés bactériennes dégradant l'atrazine.

Dans une dernière partie les conclusions générales de l'ensemble de ces travaux seront exposées ainsi que les perspectives se profilant à l'issue des résultats obtenus.

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

Ce chapitre matériels et méthodes a pour objectif i) d'apporter des précisions sur la méthodologie et sur certains protocoles décrits dans les articles et ii) de développer les différentes étapes de mise au point réalisées en amont des expérimentations présentées dans les articles. Il comprend également un article scientifique issu de la mise au point d'un protocole d'extraction d'ARN de sol.

1. Dispositif expérimental et production de microsites de sol

1.1. Matériel biologique

1.1.1. Les lombriciens

Une seule espèce de lombriciens a été utilisée au cours de ce travail de recherche, l'espèce *Lumbricus terrestris* (Linné, 1758) (figure II-1). Il s'agit d'un ver de terre anécique, c'est-à-dire à forte capacité fouisseuse très répandu dans les sols agricoles tempérés (Le Bayon et al., 2002) et pour lesquels l'élevage en microcosme est maîtrisé. Les vers proviennent d'une prairie permanente (Beaulieu, Rennes). Ils ont été collectés par la méthode au formol (Bouché and Aliaga, 1986), puis rincés à l'eau plusieurs fois. Ils sont ensuite élevés à 12°C dans le sol agricole qui servira aux expérimentations à venir, des mottes d'herbe avec leurs racines assurant leur nutrition.



Figure II-1: A. *Lumbricus terrestris*, B et C. Méthode au formol

Deux jours avant l'expérimentation et leur introduction dans les microcosmes de sol, les vers sont triés puis regroupés en lots homogènes de trois individus en fonction de leur biomasse et de leur maturité sexuelle (juvénile/subadulte/adulte) (annexe 1). Tous les lots possèdent des biomasses totales proches.

1.1.2. Les souches bactériennes dégradant l'atrazine

Deux souches bactériennes dégradant l'atrazine ont été utilisées pour inoculer le sol dans certaines expérimentations : *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995) et *Chelatobacter heintzii* SR3 (Rousseaux et al., 2001) qui possèdent respectivement les gènes *atzABCDEF* et *atzABC – trzD* portés sur des plasmides. Ces souches sont conservées sur boîtes de pétri avec un milieu minimum (MS) (mineral salt medium (Topp et al., 2000b) 1.6 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.4 g.L⁻¹ KH₂PO₄, 0.2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0.1 g.L⁻¹ NaCl, 0.02 g.L⁻¹ CaCl₂, 1mL.L⁻¹ solution trace métaux et 1mL.L⁻¹ solution de vitamine) contenant de l'atrazine (0.5 g.L⁻¹) comme seule source d'azote et du citrate (1 g.L⁻¹) comme source de carbone.

Pour la préparation des inocula, une colonie de *Pseudomonas* sp. ADP ou de *C. heintzii* SR3 est tout d'abord utilisée pour ensemer 5 ml de milieu MS contenant 30 mg.L⁻¹ d'atrazine et 1 g.L⁻¹ de citrate. Les cultures sont placées à 28°C sous agitation continue (150 rpm). La présence des différents gènes de dégradation est vérifiée par PCR. Un millilitre de ces cultures mères est ensuite utilisé pour inoculer 300 ml d'un milieu riche TY (5 g. L⁻¹ de bacteriotryptone, 3 g.L⁻¹ d'extraits de levure et 66 mg.L⁻¹ de CaCl₂). Les cultures sont placées à 28°C sous agitation continue (150 rpm) pendant 15h. La D.O. à 600 nm est mesurée en fin d'incubation afin d'ajuster la concentration des futurs inocula (une unité de D.O. à 600 nm correspond à 10⁸ unités formant des colonies (CFU)). Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min et les culots sont lavés deux fois avec du milieu minimum KNAPP (1 g l⁻¹ K₂HPO₄, 1 g l⁻¹ KH₂PO₄, 40 mg l⁻¹ MgSO₄.7 H₂O, 4 mg l⁻¹ FeCl₃, pH 6.6). Les culots sont finalement remis en suspension dans un volume de milieu KNAPP calculé pour que 30 ml permettent l'inoculation du sol de chaque microcosme à une concentration de 1.6 x 10⁷ CFU par g de sol sec.

1.2. Le sol

Deux sols différents ont été utilisés durant ce travail de thèse (tableau II-1). Les sols ont été prélevés dans l'horizon superficiel (0-30 cm) de parcelles agricoles situées sur les domaines expérimentaux de l'INRA d'Epoisses (21, Bourgogne) et de Vezin le Coquet (35, Bretagne).

Tableau II-1 : Caractéristiques des sols utilisés pour les microcosmes

Sol	Composition (%)			pH	% de matière organique
	argile	limon	sable		
Epoisses	43.2	50.3	6.5	7.5	3.25
Vezin	14.3	72.2	13.5	6.4	1.8

La parcelle du sol d'Epoisses a été cultivée pendant une dizaine d'années jusqu'en 2000 avec du maïs sous traitement d'atrazine. A partir de cette date une rotation blé tendre/orge d'hiver a été mise en œuvre. Ce sol est capable de rapidement minéraliser l'atrazine (Rousseaux et al., 2001).

La parcelle du sol de Vezin est cultivée en alternance maïs/plante légumineuse depuis au moins 1993 et a donc été régulièrement traitée à l'atrazine jusqu'à son interdiction en 2003. Ce sol minéralise lentement l'atrazine (Kersante et al., 2006).

Ces sols sont tamisés à 4 mm et conservés frais (environ 20% d'humidité) à 4°C jusqu'à leur utilisation.

1.3. L'atrazine

Le détail des différentes molécules d'atrazine utilisées est présenté dans le tableau II-2. Avant chaque expérimentation, le sol a été prétraité avec 1.5 mg d'atrazine par kg de sol sec puis un second traitement correspondant à 1 kg d'atrazine par hectare a été réalisé après la construction des microcosmes, ces deux doses correspondent chacune aux recommandations d'usage couramment appliquées au champ. Selon les expérimentations, les microsites de sol générés par la macrofaune lombricienne et récoltés suite à la destruction des microcosmes ont été traités soit avec 1.5 mg d'atrazine par kg de sol sec soit avec 25 mg d'atrazine par g de sol sec.

Tableau II-2 : molécules d'atrazine utilisées

	Fournisseur	Pureté chimique	Pureté radiochimique	Activité spécifique	enrichissement isotopique
atrazine froide	Sigma-Aldrich	99%			
atrazine froide	Syngenta	98%			
¹⁴ C-ring atrazine	Sigma-Aldrich		98%	910 MBq.mmol ⁻¹	
¹⁴ C-ring atrazine	UMR Ecobio / Sigma-Aldrich		91%	383 MBq.mmol ⁻¹	
¹⁴ C-ethyl atrazine	INRA Dijon / IsotopChim		98%	1776 MBq.mmol ⁻¹	
¹³ C-ethyl atrazine	Innovation et Chimie Fine	>97%			>98%

1.4. Les microcosmes de sol

Deux types de microcosmes ont été utilisés en fonction du sol manipulé. Pour le sol de Vezin, les microcosmes sont ceux décrits par Binet et Trehen (1992) et Kersanté (2003). Ils

sont formés de deux cylindres de polychlorure de vinyl (PVC) superposés et la partie supérieure contient le sol et constitue donc l'habitat des vers (figure II-2A). Elle mesure 9.4 cm de diamètre intérieur et 30 cm de hauteur.

Les propriétés physico-chimiques du sol d'Epoisses étant différentes de celles du sol de Vezin, les colonnes ont du être adaptées pour permettre un bon démoulage. Ainsi, ces microcosmes consistaient en des cylindres de PVC de 11.6 cm de diamètre intérieur et de 21 cm de hauteur fermés à leur extrémité inférieure par une toile de nylon (figure II-2D). Ces microcosmes s'ouvrent en deux dans leur longueur ce qui permet d'accéder facilement au sol.

Dans chaque cas, la colonne de sol est formée à partir de sol frais (22% d'humidité) et le sol est compacté sur une hauteur de 15 cm pour obtenir une densité de 1.4 et 1.2 g de sol sec par cm^3 pour les sols de Vezin et d'Epoisses respectivement.

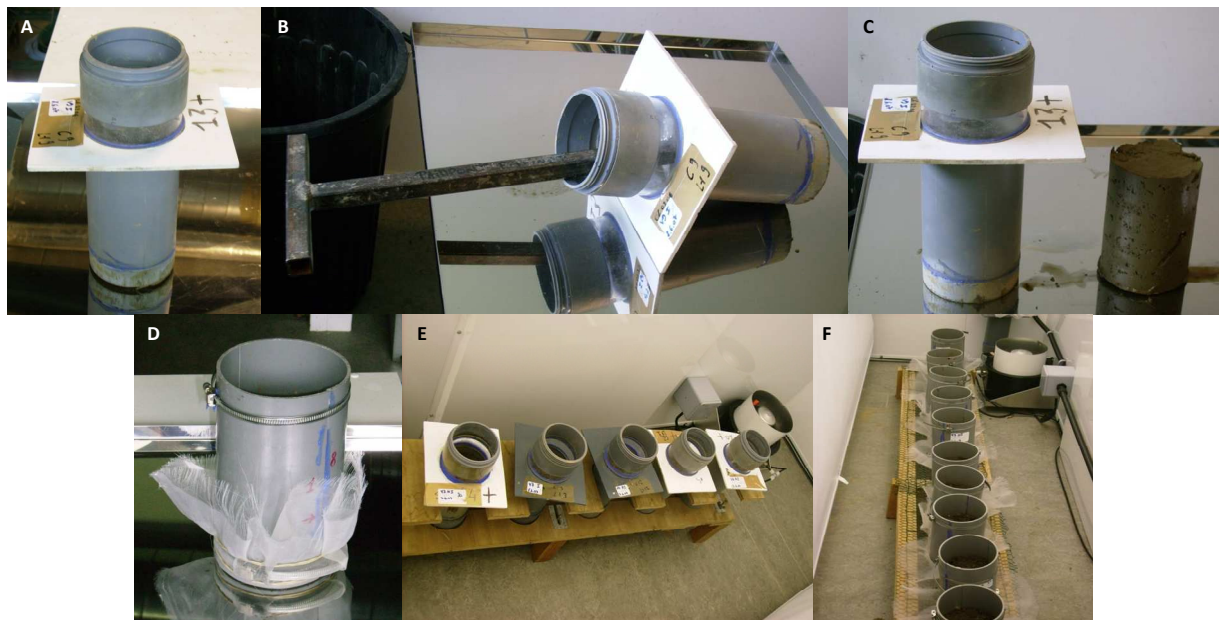


Figure II-2: A. microcosme pour le sol de Vezin, B. Démoulage de la colonne, C. le microcosme et la colonne de sol qu'il contenait, D. microcosme pour le sol d'Epoisses, E. et F. Dispositif expérimental dans la chambre climatique

Ainsi, pour chaque expérimentation, la procédure d'obtention des microsites de sol issus de la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne est identique. Le sol prétraité à l'atrazine et inoculé ou non par des souches bactériennes dégradantes est placé dans les microcosmes qui sont incubés dans une chambre climatique à 12°C avec une photopériode 12 : 12. Les vers de terre sont ensuite déposés à la surface de la colonne de sol. Une fois qu'ils ont pénétré dans le sol, un second traitement à l'atrazine est réalisé. Les turricules, sauf les premiers émis après la pénétration des vers, sont récoltés tous les deux jours. Après une dizaine de jours, les microcosmes de sol sont déstructurés, les vers sont récupérés, pesés,

ébouillantés et leur contenu digestif (endentère) est récupéré. Les deux premiers millimètres des parois de galeries sont récoltés à l'aide d'une fine spatule et l'ensemble des parois de galerie récupéré pour un microcosme est regroupé en un seul échantillon (annexe 1). Enfin, du sol environnant non bioturbé ('bulk soil') par le ver est récupéré comme sol contrôle. L'ensemble de ces microsites de sols caractéristiques de la bioturbation du sol par les vers de terre est conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

2. Mesure de l'activité de minéralisation de l'atrazine

Le suivi de la minéralisation a été réalisé par respirométrie selon deux techniques en fonction des expérimentations. Les cinétiques de minéralisation réalisées à l'INRA de Dijon ont été effectuées en dispositifs miniaturisés. Les échantillons de sol (de 250 à 500 mg de sol frais) traités à l'atrazine marquée au ^{14}C sont incubés dans des plaques à micro-puits, recouvertes d'un papier Whatman trempé avec une solution d'hydroxyde de baryum (BaOH) (Soulas, 1999). Le $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$ provenant de la minéralisation de l'atrazine est précipité sur le papier Whatman et après 2 h de séchage à 80°C, les membranes sont scannées à l'aide d'un phosphore imager (Storm®, Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA). Les données obtenues sont analysées avec le programme ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA).

Les cinétiques de minéralisation réalisées à Rennes ont été effectuées sur 10 g de sol frais traités à l'atrazine marquée au ^{14}C et incubés dans des bocaux en verre en présence d'un piège à CO_2 (30 ml de NaOH 0.5N) (figure 3B). Un millilitre de ce piège est ajouté à 5 mL de liquide scintillant (ACSII, Amersham) et le $^{14}\text{C}\text{-CO}_2$ piégé est mesuré avec un compteur à scintillation liquide (Tricarb 1900Tr, Packard). En parallèle, la respiration totale a également été déterminée. Pour cela 5 mL du piège à CO_2 dilués avec 5 mL d'eau distillée auxquels sont ajoutés 5 ml de BaCl_2 pour bloquer la fixation de CO_2 sont titrés avec de l'acide chlorhydrique 0.25N en présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré. La quantité de CO_2 respirée est mesurée par différence avec un blanc (figure II-3A).

Dans chaque cas, 5 répétitions ont été réalisées pour chaque condition.



Figure II-3: A. Dispositif expérimental pour le suivi de la minéralisation de l'atrazine et de la respiration, B. Bocaux de verre dans lesquels est incubé le sol avec les pièges à CO₂.

3. Extraction des acides nucléiques de sol

3.1. Extraction d'ADN de sol

Le protocole d'extraction d'ADN de sol utilisé a été développé à l'INRA de Dijon et correspond à une modification de la 'MS laboratory method' (tableau II-3) publiée par Martin-Laurent et al. (2001).

Tableau II-3 : protocole d'extraction d'ADN de sol (MS laboratory method modifiée, (d'après Martin-Laurent et al. 2001))

<u>Lyse cellulaire</u>	250 mg sol frais
	500 mg billes de verre 106 µm
	2 billes 2 mm
	1 mL tampon extraction
	vibrobroyage 1600 rpm 30 sec
<u>Extraction acides nucleiques</u>	70°C 10 min
	centrifugation 14000 g 1 min 4°C → surnageant
	0.1 vol NaAcétate 3M pH 5.2
	10 min glace
	centrifugation 14000 g 5 min 4°C → surnageant
	1 vol isopropanol froid
	30 min -20°C
	centrifugation 13000 rpm 30 min 4°C → culot
	lavage ethanol 70%
<u>Purification ADN</u>	repris dans 100 µL H ₂ O stérile
<u>Purification ADN</u>	colonne PVPP
	colonne Sépharose 4B

La composition du tampon d'extraction est la suivante : 1 mL TRIS 1M, 2 mL EDTA 0.5M, 1 mL NaCl 1M, 1 mL SDS 20%, 0.5 mL PVP 20%, 4.5 mL H₂O.

3.2. Extractions d'ARN : développement d'un protocole

En travaillant sur les microsites de sol issus de la bioturbation du sol par les lombriciens, nous avons été confrontés au fait que la taille de nos échantillons était limitée. Alors que la majorité des protocoles d'extractions d'ARN de sol connus sont basés sur des quantités initiales de sol allant de 1 à 10 g pour des rendements d'ARN de qualité extrait souvent très bas (Tsai and Olson, 1991; Moran et al., 1993; Felske et al., 1996; Borneman and Triplett, 1997b; Duarte et al., 1998; Burgmann et al., 2003), nous avons travaillé avec des échantillons de l'ordre de 250 mg. De plus, dans l'objectif de réaliser de la RT-qPCR, nous avons besoin d'un protocole d'extraction d'ARN de sol permettant d'obtenir des quantités suffisamment importantes. Nous avons donc développé un nouveau protocole d'extraction d'ARN de sol qui est présenté sous la forme d'un article scientifique. Cet article reprend les différentes étapes d'optimisation réalisées et montre leur impact sur la qualité et les rendements d'extraction. Ce protocole a été testé efficacement sur différents sols et les ARNs étaient à chaque fois amplifiables par RT-PCR. De plus, la quantification des expressions de l'ARNr 16S et d'un gène fonctionnel codant pour la dégradation de l'atrazine (*atzD*) a été réalisée à partir des ARN extraits levant ainsi un verrou pour l'étude des fonctions supportées *in situ* par le sol.

Optimization of RNA extraction from small soil samples to quantify gene expression (article 1)

Cecile MONARD¹ et par ordre alphabétique Françoise BINET¹, Oscar LIMA¹, Fabrice MARTIN-LAURENT² et Philippe VANDENKOORNHUYSE¹

¹CNRS / Université de Rennes, UMR 6553 EcoBio, IFR 2116 / FR 90 CAREN, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 RENNES Cedex, France

²INRA / Université de Bourgogne, UMR Microbiologie et Géochimie des Sols, CMSE-INRA, 17 rue Sully, 21065 Dijon Cedex, France

Abstract

One of the mainstreams of the current research in ecology is the understanding of the functions of microorganisms in soils. Whereas most of these microorganisms are not cultivable, culture independent molecular tools allow access to this diversity and to the functions sustained in soils. However, these methods require nucleic acid extraction from soil that is a complex matrix of mineral and organic matter, thus optimized protocols must have been developed. Contrarily to DNA, RNA is degraded very rapidly by RNases and is present in soil in small amount as it is only synthesized by active bacteria. Its extraction from soil to study *in situ* metabolic activity is so a significant challenge. Thus gene expression in soils of active microorganisms involved in the ecological processes has been rarely addressed until now because of the difficulty to extract high quantity of high quality RNAs from soil samples. We have developed and optimized a method to extract the total RNAs from small soil samples by testing different parameters for the cellular lysis, the isolation of nucleic acids and the separation of RNA from DNA. This method was reproducible, allowed recovery of RNA from 250 mg of fresh soil at the same or even improved yield as the available method published in the literature and was shown useable for the five soils tested. Furthermore, we demonstrate that these RNAs were of good quality and not contaminated because they were amplifiable (RT-PCR) and quantifiable (RT-qPCR). Highly represented transcripts as SSU rRNAs and lowly expressed gene as *atzD* were both suitable for detection and quantification for the soils tested. This optimized method allowed *in situ* transcriptional analysis to study functional diversity and activity in soils. Furthermore, we speculate that this new method of RNAs extraction will be useable for a wider range of sample than soils.

1. Introduction

Soil bacteria are numerous and highly diverse (Fierer et al., 2006; Torsvik et al., 1990), sustaining mainly functions implied in the cycling of the nutrients and in organic compounds degradation (Nannipieri et al., 2003). Thus the study of the bacterial functions in their habitat is a mainstream of research in ecology and environmental microbiology

Classical microbiological methods are based on the cultivation of microorganisms prior to analyses but it has been estimated that, in soils, the major reservoir of microorganisms on earth, only 1% of the 10^9 bacterial cells per gram of soil were culturable in laboratory conditions (Davis et al., 2005). The development of culture independent methods greatly improved our ability to analyze and investigate natural microbial communities whatever the habitat including soils. Thus, molecular techniques using DNA isolated from soil have been much developed (e.g. Johnston et al., 1996; Ogram et al., 1987; Selenska et al., 1992; Steffan et al., 1988; Tsai et al., 1991; Zhou et al., 1996). Soil DNA is often used as template for PCR amplification of bacterial 16S rRNA genes and community analysis. Even if really informative, DNA analyses suffer about the obvious limit in the understanding of bacterial functioning in soils or in other habitats as they take into account active, along with dormant, and also dead microorganisms. Thus, RNA analysis allows to describe active bacterial community solely from an environmental sample since only this metabolic state of bacteria synthesize RNAs (Wagner, 1994). In addition to rRNA, the recovery of mRNA allows to study the functions expressed by the genomes at a given sampling date since its half life is short (Burgmann et al., 2003; Kelly, 2003; Sessitsch et al., 2002).

As for DNA, RNA extraction from soil is difficult because soil is a complex matrix composed of mineral and organic matter that can interfere with extraction. Clay particles adsorb nucleic acids limiting their extraction and phenolic compounds (humic and fulvic acids) coextracted with nucleic acids and are inhibitors of DNA polymerase and thus PCR. (Dong et al., 2006; Purdy, 2005). Moreover recovery of high quality RNA from soil samples is a significant challenge as RNA could be degraded very rapidly by RNases and is only synthesized by active bacteria.

Since the last decades, different protocols of RNA extraction from soils have been developed (Borneman et al., 1997; Burgmann et al., 2003; Duarte et al., 1998; Felske et al., 1996; Hurt et al., 2001; Moran et al., 1993; Sessitsch et al., 2002; Tsai et al., 1991) however the low yield of good quality extracted RNAs recovered requires to work with 'large' soil samples (apart from Borneman et al., 1997; Burgmann et al., 2003). Because, in many cases

the sample size is limited, the first aim of this study was to develop an efficient protocol to extract total RNAs from small amount of soil (250 mg of fresh soil). The second aim was to have a method that is useable for a variety of soil types and the third objective was to have a good yield of high quality of extracted RNAs to make possible the analyses of gene expression by RT-qPCR. To do so, we have tested different protocols and made modifications and optimizations to improve the methods of cellular lysis, the isolation of nucleic acids and the separation of RNA from DNA. We are providing results highlighting the applicability and robustness of our optimized method of RNA extraction from soils.

2. Materials and methods

2.1. Soil samples

Soils were collected from the upper layer (0-20 cm) of 5 different agricultural sites in France: Epoisses (Côte d'Or), Vezin (Ille et Vilaine), La Côte Saint André (LCSA) (Isère), Montrond (Isère) and Kerguehennec (Morbihan). These soils were chosen because they differed in their particles size distribution, their pH and their organic matter content (Table 1). These 5 soils were sieved at 4 mm and kept at 4°C until use.

Table 1: Soil characteristics and RNA extraction yields

Soil	Particle size distribution (%)			pH	Organic matter (%)	µg of RNA per g of fresh soil
	clay	loam	sand			
Epoisses	46.1	47.2	6.7	6.7	3.25	1.27
Vezin	14.3	72.2	13.5	6.4	1.80	2.47
LCSA ^a	17	35.3	47.7	7	2.10	3.76
Kerguehennec	16.6	46.3	37	6.3	3.80	3.86
Montrond	18.2	38.2	43.6	5.9	6.70	4.22

^a LCSA La Côte Saint André

2.2. Optimization of RNA extraction from small soil samples

Three optimization steps were performed to develop an effective protocol for RNA extraction from small quantities of soil (Table 2). These steps were realized using 250 mg of Epoisses soil.

Table 2: Optimization steps of the soil RNA extraction protocol

Optimization steps	Conditions tested
Cellular Lysis	phenol pH 8.0 phenol pH 6.6 phenol pH 5.0
Nucleic acids isolation and purification	precipitation with 0.1 volume sodium acetate and 2 volumes ethanol purification with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) + precipitation with 0.1 volume LiCl 8M and 2.5 volu
Separation of RNA from DNA	Qiagen RNA/DNA Mini Kit + Qiagen RNeasy mini kit 1 ml Trizol + 200 µl chloroform + precipitation with 500 µl isopropanol

2.2.1. pH for mechanical lysis

Cellular lysis was performed in presence of phenol and 3 different pH were tested: phenol saturated with 100 mM of Tris-HCl pH 8.0, with 100 mM phosphate buffer pH 6.6 or with 100 mM sodium acetate pH 5.0. The soil was first mixed with 370 µl of buffer corresponding to the one used to saturate the phenol. Cellular lysis was then performed by bead beating with 500 mg of 106-µm-diameter glass beads (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 35 µl 20% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5 mg of diatomaceous and 600 µl phenol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The effect of phenol pH on RNA quality and quantity was estimated.

2.2.2. Nucleic acids isolation and purification

After cellular lysis, two ways of nucleic acids isolation were tested. (i) Nucleic acids were precipitated with 0.1 volume of sodium acetate 3M and two volumes of cold ethanol (Sambrook et al., 2001). (ii) Before nucleic acids precipitation, a purification step was performed with addition of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). This procedure removes proteins that are often coextracted with nucleic acids (Purdy, 2005; Sambrook et al., 2001). Nucleic acids were then precipitated with 0.1 volume of LiCl 8 M and 2.5 volumes cold ethanol as LiCl does not efficiently precipitate DNA, protein or carbohydrates (Barlow et al., 1963).

2.2.3. Separation of RNA from DNA

Two different RNA extraction procedures were tested. (i) Commercial columns were first used to separate RNA from DNA. The Qiagen RNA/DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used following the manufacturer recommendation for isolation of total RNA from bacteria. RNA was then purified using the protocol of RNA cleanup of the Qiagen RNeasy mini kit. (ii) One milliliter of Trizol (TRI REAGENT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the nucleic acids isolated previously (Chomczynski, 1993; Chomczynski et al., 1987; Sambrook et al., 2001). The samples were vortexed and 200 µl of chloroform were added. DNA and protein are extracted into the organic phase, remaining the RNAs in the

aqueous phase which can be precipitated by adding 500 μ l of isopropanol as described by the manufacturer.

2.3. Extraction of RNA from diverse soils

The optimized method to extract RNAs from soil samples is provided in Figure 1. This protocol was used to extract RNA from 5 different soils in 3 replicates. All RNA extracts were subjected to treatment with RNase-free DNase I in presence of RNasin[®] Plus RNase inhibitor (Promega, Madison, WI, USA).

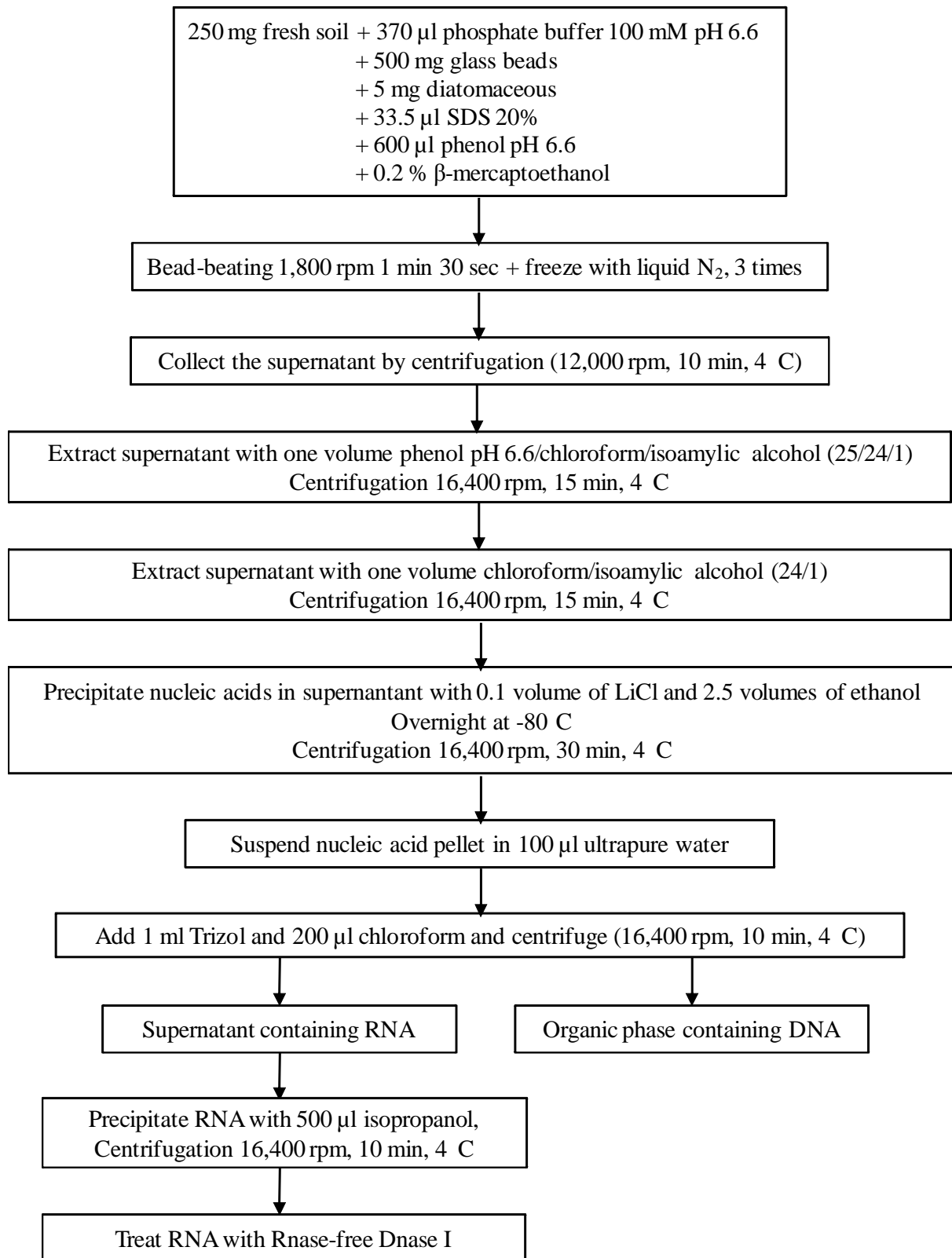


Fig. 1. Unitary steps of the optimized protocol for the extraction of RNAs from soil samples.

2.4. Evaluation of RNA quality and quantity

RNA was quantified spectrophotometrically with a NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer at 260 nm and RNA purity was estimated by calculating the 260/280 and 260/230 absorbance ratios (NanoDrop Technologies, Wilmington, MA, USA). RNA quality was also assessed either by (i) 1% agarose/Tris-Borate-EDTA (TBE) gel electrophoresis and detection under UV after incubation with ethidium bromide and by (ii) microfluidic electrophoreses using the Experion Automated Electrophoresis System and the RNA HighSens lab-chips (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA).

2.5. RT-PCR and RT-qPCR

RNA quality was assessed by RT-PCR using the total RNAs extracted (up to 1.5 ng) from the 5 different soil samples using the Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The reactions were carried out in a final volume of 50 µl with 10 pmol of the primers Eub_519f and Eub_1390r specific for bacteria (Vandenkoornhuyse et al., 2007).

RT-qPCR reactions were also performed on the total RNAs extracted from the Epoisses and Vezin soils to quantify the 16S rRNA and *atzD* gene expressions since both soils have a history treatment by atrazine. This RT-qPCR experiment was done as a control of amplificability of the extracted RNAs. Reactions were performed as described by Devers et al. (2004) with 125 ng of RNA. The 515R 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3' (Xia et al., 2000) and the Dr 5'-GGGTCTCGAGGTTTGATTG-3' (Devers et al., 2004) primers were used as reverse primers for the reverse transcription of the 16S rRNA and *atzD* mRNA respectively. Ten units of AMV-RT and 200 units of MMLV-RT (Promega, Madison, WI, USA) were used as reverse transcriptases. The quantitative PCRs were carried out in an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) apparatus with QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The 25 µl reaction mixtures contained 12.5 µl of SYBR Green PCR master mix containing 'HotStar' Taq DNA polymerase, 0.3 µM forward primer (341F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' (Muyzer et al., 1993) and Df 5'TCCCACCTGACATCACAAAC-3' (Devers et al., 2004) for the amplification of the 16S rRNA and the *atzD* genes respectively), 0.3 µM reverse primer (515R and Ar, see above), 5 µl of DNA template, 1 µl of T4 gp 32 (QBiogene, Illkirch, France) and 5 µl of ultrapure water. The thermal cycling conditions for the 16S rRNA sequence amplification consisted of

an initial step of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 35 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and 81°C for 15 sec. The last cycle consisted of 15 sec at 95°C, 15 sec at 60°C and 15 sec at 95°C. The thermal cycling conditions for *atzD* quantification were identical except for the initial step which consisted of 10 min at 95°C followed by 40 cycles instead of 35.

3. Results

3.1. RNA separation from DNA

The use of Qiagen columns and the one of Trizol were compared for RNA separation from DNA after cellular lysis and nucleic acids isolation. RNA was still reverse transcribed and amplified after passage through the two Qiagen columns (data not shown), despite the fact that most of the RNAs was lost (Fig. 2). Before passage through the columns, 3.15 µg of nucleic acids g⁻¹ dry soil were detected and in the flow through of the RNeasy mini kit column, only 0.42 µg of RNA g⁻¹ dry soil was recovered. Similarly, most of the RNAs were lost using Trizol to separate RNA from DNA. From the 18.14 µg of nucleic acids g⁻¹ dry soil initially detected, only 0.46 µg of RNA g⁻¹ dry soil was found. However, the RNA quality obtained with the use of Trizol was better compared to the extracted RNAs from the Qiagen method (Fig. 3 columns 1, 2, 3 and 4). The two separation methods did not differ significantly in terms of 260/280 and 260/230 absorbance ratios (data not shown). At the end of each procedure, the ratios indicated the presence of contaminants such as proteins absorbing at 280 nm and others absorbing at 230 nm. According to these results, the Trizol reagent was used to separate RNA from DNA in the next optimization steps.

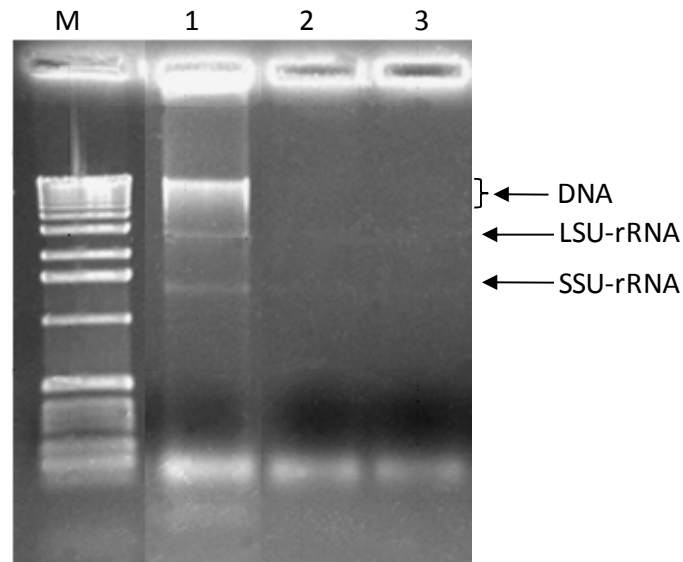


Fig. 2. Nucleic acids on 1% agarose/TBE/EtBr gel from Epoisses soil. (M) 1 kb ladder, (1) nucleic acids before passage through the Qiagen columns, (2) RNA in the flowthrough from the RNA/DNA Mini Kit, (3) RNA in the flowthrough from the RNeasy mini kit.

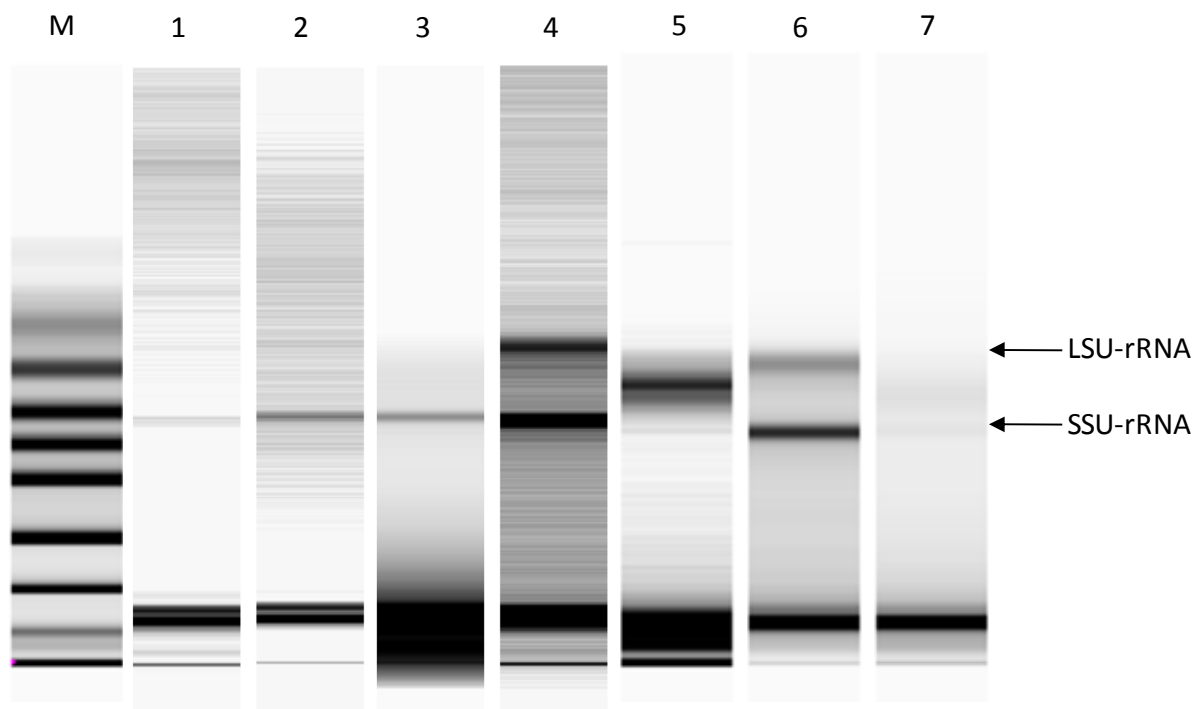


Fig. 3. Microfluidic electrophoresis of RNA from Epoisses soil adjusted at $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. (M) ladder, (1) RNA before passage through the Qiagen columns, (2) RNA in the flowthrough from the RNeasy mini kit, (3) RNA before Trizol separation, (4) RNA after Trizol separation, (5) RNA obtained with phenol pH 5.0 extraction, (6) RNA obtained with phenol pH 6.6 extraction and (7) RNA obtained with phenol pH 8.0 extraction.

3.2. Optimization of nucleic acid isolation and purification

After cell lysis, when nucleic acids were purified with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) before their precipitation with LiCl and ethanol, the 260/280 absorbance ratio was significantly higher than with direct precipitation of nucleic acids with sodium acetate and ethanol (1.74 vs 1.26). This indicated that this additional step for nucleic acids purification using LiCl instead of sodium acetate improve the removal of proteins coextracted with nucleic acids. The RNA recovered at the end of the extraction procedure was highly increased as on average 1.9 μg of RNA g^{-1} dry soil were obtained when using the phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and LiCl while only 0.46 μg of RNA g^{-1} dry soil were obtained using conventional precipitation with sodium acetate 3M and two volumes of ethanol. According to these results, purification of nucleic acids with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and precipitation with LiCl were applied in the next optimization step.

3.3. Optimization of phenol pH during cellular lysis

Among the three phenol pH tested during cellular lysis, the result obtained with phenol pH 5.0 was the less effective in terms of quantity (0.66 μg RNA g^{-1} dry soil were extracted) and quality as shown in Fig. 3 (column 5). The use of phenol pH 6.6 and 8.0 allows extraction of similar quantities of RNA (1.92 and 1.9 μg RNA g^{-1} dry soil respectively) but RNA quality differed greatly (Fig. 2, columns 6 and 7). The use of Phenol pH 6.6 provided better results to perform the cellular lysis.

3.4. Extraction of RNA from different soils

The optimized method is described in Figure 1 and was tested with 5 different soils samples. After RNA precipitation, the pellet obtained with the Epoisses soil was the only colored less, pellets from the other soils were brownish. However, the 23S and 16S rRNA bands were clearly observed for all the RNAs extracts from the five soils (Fig. 4) but differed in intensities. As the method was optimized with the Epoisses soil, good quality RNA was obtained from this soil. The same result was observed with the Montrond soil (Fig. 4). Spectrophotometrically RNA quantification differed between the 5 soils and was confirmed by microfluidic electrophoresis quantification. Despite optimizations were realized with the

Epoisses soil, the extraction yield in this soil was the lowest (Table 1) with the smallest 260/280 absorbance ratio (1.29). The higher RNA extraction yield was obtained with the Montrond soil. Interestingly, all the RNA extracts from the 5 soils were suitable to perform reverse transcription and PCR amplification (data not shown). Direct PCR amplification from the RNA extracts did not produce any amplification product showing the efficiency of DNase treatment (data not shown).

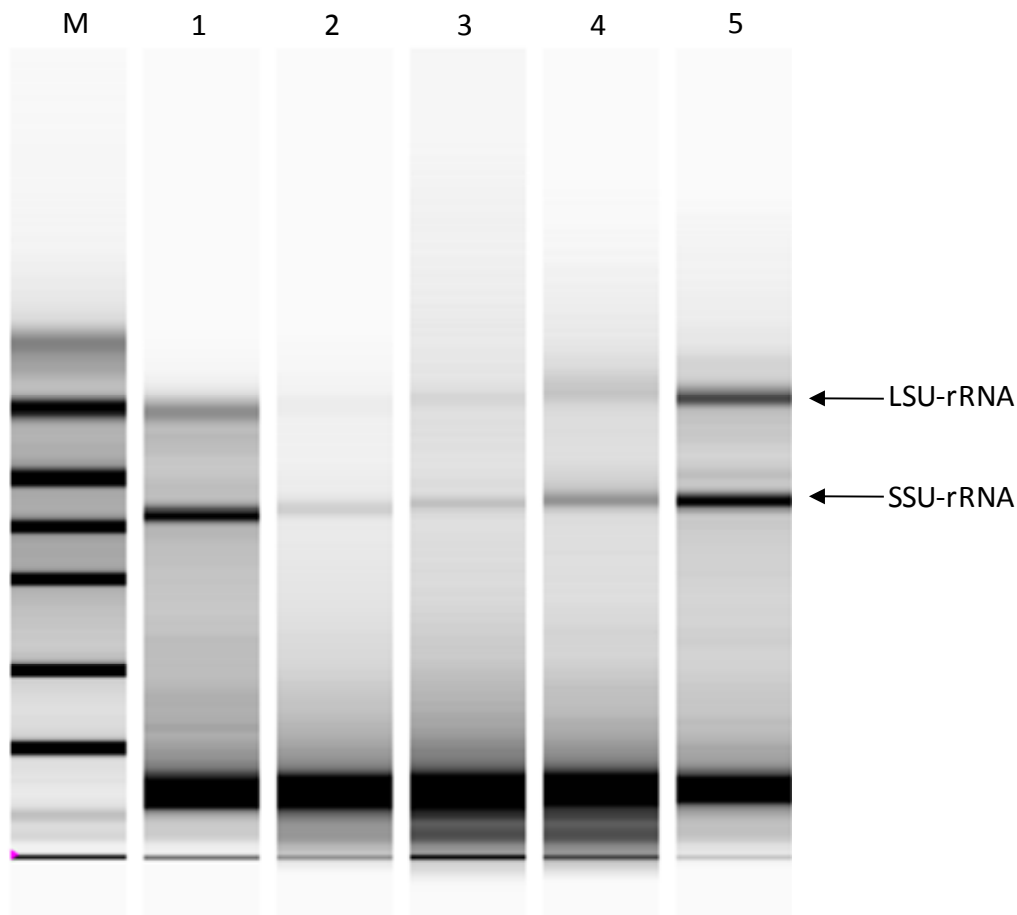


Fig. 4. Microfluidic electrophoresis of RNA from different soils adjusted at $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. (M) ladder, (1) Epoisses soil, (2) Vezin soil, (3) LCSA soil, (4) Kerguehenec soil and (5) Montrond soil.

The 16S rRNA quantified from the Epoisses and Vezin soils ranged from $3.46 \cdot 10^{11}$ to $6.81 \cdot 10^{11}$ and from $9.12 \cdot 10^{10}$ to $2.5 \cdot 10^{11}$ copy number g^{-1} dry soil respectively. The mRNAs extracted from these soils were also amplifiable by RT-PCR. The expression of the *atzD* gene was quantified in Epoisses and Vezin soils. This gene was expressed at different levels in these two soils. On average $1.82 \cdot 10^7$ copies of *atzD* g^{-1} dry soil were obtained in Epoisses soil while only $5.1 \cdot 10^5$ copy g^{-1} dry soil were detected in Vezin soil.

4. Discussion

Soil is a complex environment where diversity of active microorganisms is huge (Handelsman, 2004; Torsvik et al., 1990) and sustains a high number of functions (Prosser, 2002). To link microbial diversity to functions in soils, different molecular techniques are now available (Nannipieri et al., 2003). However, the use of DNA in microbial ecology implies that the entire microbial communities is assessed regardless of their activity (Prosser, 2002). Dead, dormant and active microorganisms are thus analyzed at the same level and simultaneously, likely inducing bias. For example, if the huge diversity of microorganisms in soil is widely acknowledged, there are few available studies which have focused on the active microorganisms (Chen et al., 2007; Felske et al., 1998) and quantification of functional gene expression has just been developed (Han et al., 2004; Nicolaisen et al., 2008). This lack in the knowledge is mainly due to the difficulty to access to the soil RNAs. Extracting RNAs from soil is considered as a difficult task compared to DNA as in addition to the difficulties associated to the mineral and organic matters of the complex soil matrix, RNA is more prone to degradation by nuclease and synthesized in lower amounts than DNA. Thus, RNA extractions from soil are still considered as a challenge in ecology and environmental microbiology although methods have been proposed (Borneman et al., 1997; Burgmann et al., 2003; Duarte et al., 1998; Felske et al., 1996; Hurt et al., 2001; Moran et al., 1993; Sessitsch et al., 2002; Tsai et al., 1991). Compared to these pre-existing methods, the optimized protocol provided herein is novel for three different aspects. Firstly, the total soil RNA can be extracted from small quantities given the yield of extraction and reproducibility. Secondly, we report herein that the method can be used with different soil matrixes. Given the fact that soil samples can be considered as 'harsh' for RNAs extractions we can speculate that this protocol should provide satisfying results for most soil samples and more widely most biological samples. Thirdly, the quality of the extracted RNAs is better than other protocols such as the Qiagen method (Fig. 3). From this protocol, we highlight herein the feasibility of *in situ* transcriptomic analyses by RT-qPCR analyses targeting the highly expressed 16S rRNAs and also genes transcribed at a lower copy number such as *atzD* mRNA.

The first optimization step highlighted the importance of the mechanical lysis associated with chemical lysis and mostly the pH of the lysis buffer. Some RNA extraction procedures previously described realized mechanical cell lysis at pH 8.0 (Borneman et al., 1997; Burgmann et al., 2003) but, maybe due to higher RNA stability, a better efficiency was obtained when using acid phenol and SDS as previously did Duarte et al. (1998). However,

this latter published procedure is an indirect two steps approach, consisting in a first step of cell extraction from soil followed by a second step of bead beating cell lysis realized on extracted cells. In the present procedure the mechanical lysis was directly applied on soil samples. The optimized lysis buffer pH might also depend on soil pH. However, the pH of the 5 soils tested did not differ significantly so the optimum lysis buffer pH (6.6) obtained with the soil from Epoisses (pH 6.7) might have corresponded to the other soils.

We observed that the simultaneous use of LiCl and ethanol to precipitate nucleic acids increased the yield of soil RNA extraction. Indeed, LiCl lowers the solubility of large RNAs (e.g. rRNAs and mRNAs) which precipitate and can be then recovered as pellet after centrifugation. This precipitation of RNA is known to be suitable to perform reverse transcription (Sambrook et al., 2001).

As proposed by Hurt et al. (2001), if quantitative recover of the DNA fraction is not particularly important, the use of Trizol is successful, because it is quicker and less expensive than commercially available anion exchange reagent systems. Our results agreed this observation. Moreover the RNA quality obtained with Trizol was higher than the one with the commercial columns. Furthermore, simultaneous extraction of DNAs and RNAs is possible since DNA can be recover from the interphase and organic phase formed after Trizol and chloroform addition. Thus this method is suitable for both analyses of DNA and RNA from the same sample. The use of Trizol is commonly used in medical science to extract microbial or viral RNA (e.g. Li-Korotky et al., 2007; Xiang et al., 2001), but it has been tested only once on soil sample (Hurt et al., 2001).

Among the 5 soils used herein, the yield of RNAs extracted varied from 1.6 to 5.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil which corresponded or even improved the one obtained with existing protocols (Borneman et al., 1997; Duarte et al., 1998; Felske et al., 1996; Moran et al., 1993 who extracted 1.9 $\mu\text{g RNA g}^{-1}$, 0.2 $\mu\text{g RNA g}^{-1}$, 3 $\mu\text{g RNA g}^{-1}$ and 1 $\mu\text{g of rRNA g}^{-1}$ respectively). By comparing the RNA extraction yields between the five soils tested, we observed that higher sand contents increased the amount of RNA recovered. The yield of soil RNA extraction did not seem to be correlated to another soil characteristic (organic matter, soil moisture). Hurt et al. (Hurt et al., 2001) observed significant relationship between RNA yield and soil moisture content but this relation was not observed in this study even if the highest RNA yield (5.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil) was obtained with the Montrond soil that had the highest moisture content (33.1%).

As the present procedure was developed with the Epoisses soil, contamination with humic acids coextracted was not observed by the RNA pellet color at the end of the extraction

procedure contrarily to the other soils. However, all the RNA extracted supported reverse transcription and PCR amplification. Quantification of bacterial activity and function expression was also feasible as tested with two soil samples. In agreement to recent studies (Han et al., 2004; Nicolaisen et al., 2008) the results obtained with this optimized RNA extraction method indicated that detection and quantification of *in situ* active bacterial community is feasible along with analysis of the gene expressions in soil, allowing to go further into the role of microorganisms in soil functioning.

References

- Barlow, J.J., Mathias, A.P., Williamson, R., Gammack, D.B., 1963. A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 13, 61-66.
- Borneman, J., Triplett, E.W., 1997. Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry.* 29, 1621-1624.
- Burgmann, H., Widmer, F., Sigler, W.V., Zeyer, J., 2003. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Applied and Environmental Microbiology.* 69, 1928-1935.
- Chen, Y., Dumont, M.G., Cebon, A., Murrell, J.C., 2007. Identification of active methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of 16S rRNA and functional genes. *Environmental Microbiology.* 9, 2855-2869.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 15, 532-534.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Davis, K.E.R., Joseph, S.J., Janssen, P.H., 2005. Effects of Growth Medium, Inoculum Size, and Incubation Time on Culturability and Isolation of Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 826-834.
- Devers, M., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods.* 56, 3-15.
- Dong, D., Yan, A., Liu, H., Zhang, X., Xu, Y., 2006. Removal of humic substances from soil DNA using aluminium sulfate. *Journal of Microbiological Methods.* 66, 217-222.
- Duarte, G.F., Rosado, A.S., Seldin, L., Keijzer-Wolters, A.C., van Elsas, J.D., 1998. Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *Journal of Microbiological Methods.* 32, 21-29.
- Felske, A., Engelen, B., Nubel, U., Backhaus, H., 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology.* 62, 4162-4167.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., Akkermans, A.D.L., 1998. Phylogeny of the Main Bacterial 16S rRNA Sequences in Drentse A Grassland Soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 871-879.

- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 626-631.
- Han, J.-I., Semrau, J.D., 2004. Quantification of gene expression in methanotrophs by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Environmental Microbiology*. 6, 388-399.
- Handelsman, J., 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*. 68, 669-685.
- Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., Zhou, J., 2001. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 4495-4503.
- Johnston, W.H., R., S., G. S., S., 1996. Direct extraction of microbial DNA from soils and sediments. In: A. A. D. L., J. D. v. Elsas, d. B. F. J. (Eds.), *Molecular microbial ecology manual*, Vol. 1.3.2., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1-9.
- Kelly, J.J., 2003. Molecular techniques for the analysis of soil microbial processes: functional gene analysis and the utility of DNA microarrays. *Soil Science*. 168, 597-605.
- Li-Korotky, H.-S., Kelly, L.A., Piltcher, O., Hebda, P.A., Doyle, W.J., 2007. Evaluation of microbial RNA extractions from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Microbiological Methods*. 68, 342-348.
- Moran, M.A., Torsvik, V.L., Torsvik, T., Hodson, R.E., 1993. Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 915-918.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*. 54, 655-670.
- Nicolaisen, M.H., Baelum, J., Jacobsen, C.S., Sorensen, J., 2008. Transcription dynamics of the functional *tfdA* gene during MCPA herbicide degradation by *Cupriavidus necator* AEO106 (pRO101) in agricultural soil. *Environmental Microbiology*. 10, 571-579.
- Ogram, A., Sayler, G.S., Barkay, T., 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*. 7, 57-66.
- Prosser, J.I., 2002. Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*. 244, 9-17.

- Purdy, K., 2005. nucleic acid recovery from complex environmental samples. In: E. Inc. (Ed.), *Methods in enzymology*, Vol. Environmental microbiology 397, pp. 271-292.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Selenska, S., Klingmüller, W., 1992. Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil. *Microb. Releases*. 1, 41-46.
- Sessitsch, A., Gyamfi, S., Stralis-Pavese, N., Weilharter, A., Pfeifer, U., 2002. RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods*. 51, 171-179.
- Steffan, R.J., Goksoyr, J., Bej, A.K., Atlas, R.M., 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2908-2915.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
- Tsai, Y.L., Olson, B.H., 1991. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 1070-1074.
- Vandenkoornhuyse, P., Mahe, S., Ineson, P., Staddon, P., Ostle, N., Cliquet, J.-B., Francez, A.-J., Fitter, A.H., Young, J.P.W., 2007. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104, 16970-16975.
- Wagner, R., 1994. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives of Microbiology*. 161, 100-109.
- Xia, T., Baumgartner, J.C., David, L.L., 2000. Isolation and identification of *Prevotella tannerae* from endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology*. 15, 273-275.
- Xiang, X., Qiu, D., Hegele, R.D., Tan, W.C., 2001. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. *Journal of Virological Methods*. 94, 129-135.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316-322.

4. Analyses moléculaires

Les différents outils moléculaires utilisés durant ce travail ont nécessité l'amplification spécifique au préalable de différents gènes. L'ensemble des amorces utilisées est présenté dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Amorces utilisées pour les différentes analyses moléculaires

Gene ciblé	Amorce	Séquence nucléotidique (5'→ 3')	Référence
16S rRNA	341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al. 1993
	515r	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Xia et al. 2000
	EUB_519f	GTTTCAGCMGCCGCGGT	Vandenkoornhuyse et al. 2007
	EUB_1390r	GTTTGACGGGCGGTGTGT	
	27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Rousseaux et al. 2001
	1492r	TACGGHTACCTTGTTACGACTT	
IGS	72f	TGCGGCTGGATCACCTCCTT	Gürtler and Stainisch, 1996
	38r	CCGGGTTTCCCCATTCCG	
<i>atzA</i>	Af	ACGGGCGTCAATTCTATGAC	Dever et al. 2004
	Ar	CACCCACCTCACCATAGACC	
<i>atzD</i>	Df	TCCCACCTGACATCACAAC	Dever et al. 2004
	Dr	GGGTCTCGAGGTTTGATTG	
<i>trzN</i>	trzNf	CACCAGCACCTGTACGAAGG	Martin-Laurent et al. 2006
	trzNr	GATTCGAACCATTCCAAACG	
<i>trzD</i>	trzDf	CCTCGCGTTCAAGGTCTACT	Martin-Laurent et al. 2006
	trzDr	TCGAAGCGATAACTGCATTG	
insert vecteur	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
	SP6	TATTTAGGTGACACTATAG	

4.1. PCR quantitative

4.1.1. Rappels du principe

L'ensemble des PCRs quantitatives ont été réalisées à l'INRA de Dijon et le SYBR Green a été utilisé comme marqueur fluorescent (figure II-4).

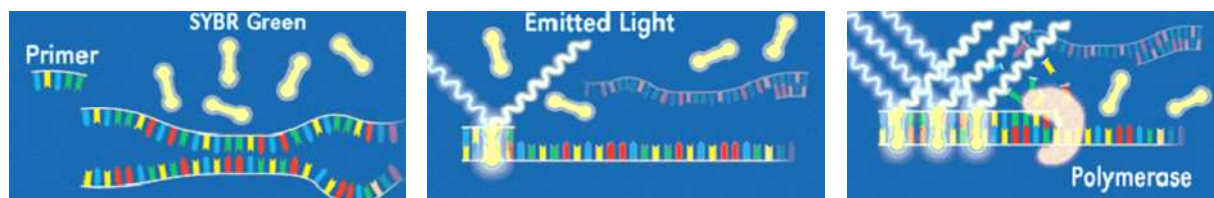


Figure II-4 : Principe de la qPCR avec l'utilisation de SYBR Green

Quand le nombre de cycles de PCR augmente, la quantité d'amplicons augmente. Le nombre de molécules de SYBR green intercalées étant proportionnel au nombre d'ADN double brins synthétisé, le niveau de fluorescence est donc relié à la quantité d'amplicons

obtenus provenant des cibles amplifiées (figure II-5). La quantification se réalise à partir du cycle seuil (cycle threshold, Ct) qui correspond au point où la fluorescence dépasse de manière significative le bruit de fond. Ce Ct est corrélé au nombre de copies initiales d'ADN cible et il est déterminé grâce à une gamme standard de dilution dont les quantités d'ADN sont connues (figure 6A). Globalement, si on a deux fois plus d'ADN cible initial, le Ct est inférieur d'un cycle. Il est ainsi possible de corréler le nombre de copies d'ADN cible et le Ct (figure II-6B).

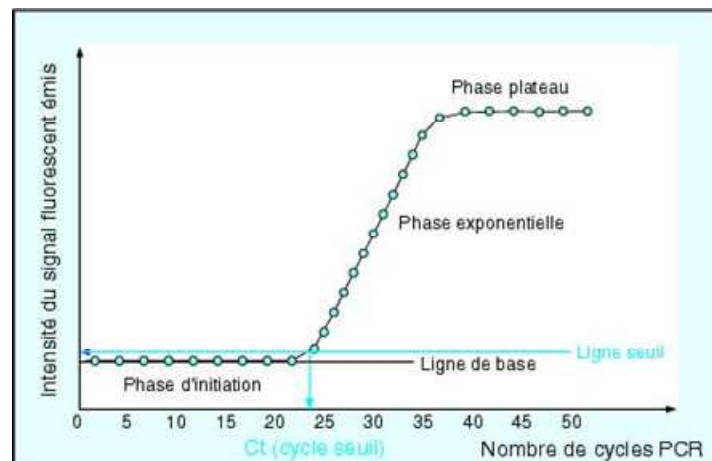


Figure II-5 : principe de la qPCR, fluorescence en fonction du nombre de cycle de PCR pour un échantillon d'ADN

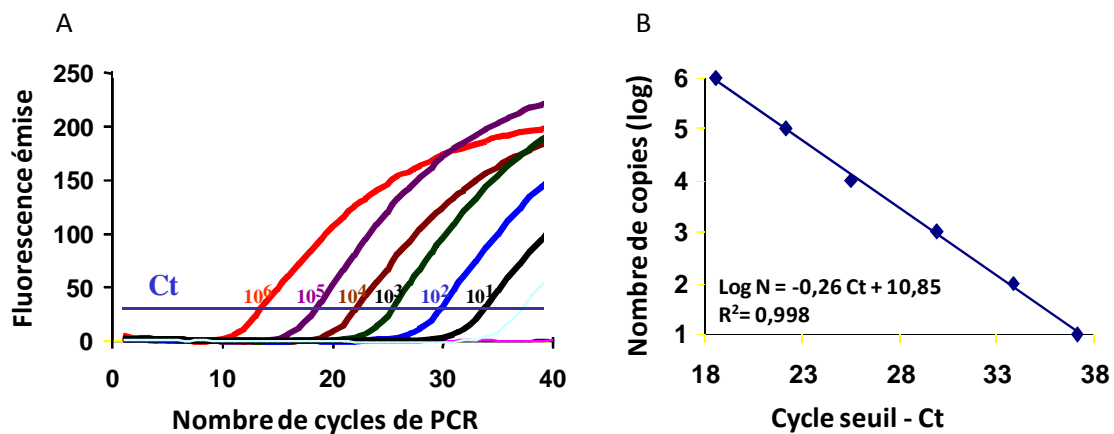


Figure II-6 : Détermination du Ct (A) et relation avec le nombre de copies (B).

4.1.2. Préparation des standards

L'utilisation de standards est donc une étape clé dans la réalisation de la qPCR. Les standards ont été réalisés pour les gènes ADNr 16S, *atzA* et *atzD*. Le gène codant pour l'ARNr 16S provient d'une souche dégradant la simazine, *Pseudoxanthomonas mexicana* et

les gènes *atzA* et *atzD* proviennent de la souche *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995). Ces gènes sont amplifiés avec les couples d'amorces 27f/1492r, Af/Ar et Df/Dr (tableau II-4), respectivement. Les produits d'amplification obtenus sont clonés (voir partie 4.5., ligation dans pGEM-T, transformation dans *E. coli* compétentes, criblage, PCR SP6/T7) et séquencés afin de connaître la séquence exacte de l'insert. A partir de ces clones, le plasmide est extrait (kit Qiagen miniprep) et linéarisé par restriction avec l'enzyme *SalI*. Les séquences de pGEM-T et de son insert étant connues, la masse molaire (g.mol^{-1}) peut être calculée par la formule : $617.7 (A + T) + 618.4 (G + C) + 157.9$

La concentration d'ADN contenue dans les échantillons de vecteurs linéarisés est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm et le nombre de copies d'ADN dans l'échantillon peut être calculée par la formule : $[\text{ADN}] (\text{g.L}^{-1}) \times \text{nombre d'Avogadro} \times \text{volume (L)} / \text{masse molaire} (\text{g.mol}^{-1})$

Le nombre d'Avogadro correspond au nombre de molécules présentes dans une mole et est égal à 6.02×10^{23} .

Une fois que l'on connaît le nombre de molécules d'ADN (nombre de copie du vecteur avec l'ADN cible inséré), des dilutions au $10^{\text{ème}}$ sont réalisées pour obtenir une gamme allant de 10^3 à 10^8 copies par échantillon pour le gène codant pour l'ARNr 16S et de 10 à 10^6 copies par échantillon pour les gènes *atz*.

4.2. RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Le principe de cette technique, brièvement abordé dans le chapitre introductif, consiste à étudier l'espace situé entre les gènes codants pour l'ARNr 16S et 23S, appelé espace intergénique bactérien (IGS). Cette zone est non codante et donc soumise à moins de pression de sélection. Elle est donc susceptible de présenter plus de variation que l'ADN codant. Les IGS sont tout d'abord amplifiés avec les amorces 72r et 38r (tableau II-4, Gürtler and Stanisich, 1996) et les produits d'amplification sont séparés par migration pendant 16h à 19mA dans un gel d'acrylamide 6%. Les gels sont ensuite révélés avec du SYBR green II (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) selon le protocole décrit par Martin-Laurent et al. (2001). Les profils RISA sont analysés avec le programme One-DScan 2.03 (Scanalytics program). Les matrices de covariances déduites des gels (présence/absence et intensité relative de chaque bande) sont analysées en analyse de composantes principales (ACP) avec le logiciel ADE-4 (Thioulouse et al., 1997).

4.3. T-RFLP

Cette technique permet l'analyse des communautés bactériennes présentes dans le sol en produisant des signatures de diversité. Cette méthode est particulièrement appropriée à l'analyse de communautés complexes, ce qui est le cas des communautés microbiennes du sol. Cette méthode a donc été choisie en couplage à la technique SIP-ARN pour l'analyse des communautés bactériennes consommant le glucose et l'acétate. Le principe présenté en introduction est rappelé figure II-7.

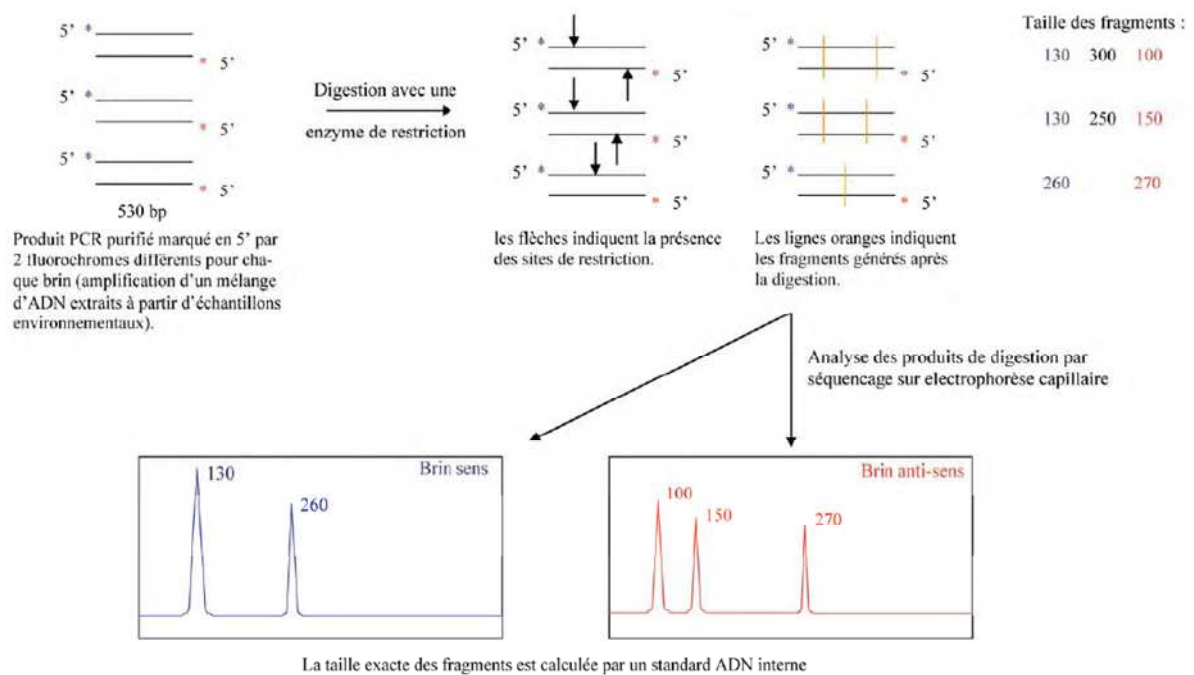


Figure II-7 : principe de la technique de T-RFLP (Terminal Fragment Length Polymorphism).

Les deux amorces utilisées sont marquées par des fluorochromes (Eub_519f marquée par une carboxyfluorescéine (6-FAM) et Eub_1390r marquée par un dérivé d'hexamidine (HEX), tableau II-4) et les produits de PCR sont digérés parallèlement par deux enzymes de restriction ce qui permet d'augmenter le niveau de résolution de la T-RFLP en générant un polymorphisme de fragments terminaux de restriction pour les brins sens et antisens respectivement (Johnson et al., 2004). Les enzymes de restrictions ont été choisies selon des cartes de restrictions obtenues à partir de séquences bactériennes provenant d'échantillons de sol. Ainsi, *HinfI* et *StyI* (figure II-8) généraient des fragments terminaux polymorphes offrant une bonne discrimination (Bougon, 2007).

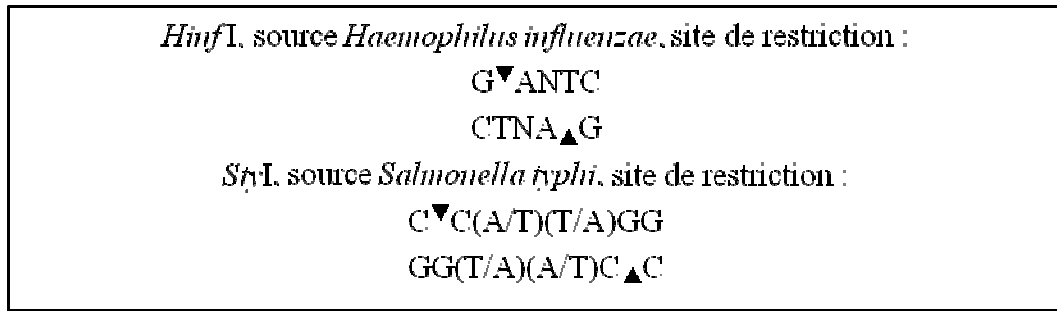


Figure II-8 : enzymes de restrictions utilisées pour la T-RFLP

Les différentes étapes de la technique de T-RFLP sont brièvement détaillées dans le tableau II-5.

Tableau II-5 : Résumé des étapes de la technique de T-RFLP

Etapes	Matériels et fournisseurs
RT-PCR avec amorces marquées par fluorochrome	Titan One Tube RT-PCR Kit, Roche
vérification de l'amplification et de la taille des produits sur gel d'agarose 1%	
Purification des produits de PCR	High Pure PCR Product Purification Kit, Roche
Restriction <i>Hinf</i> I et <i>Sst</i> I	Promega
Précipitation des produits de digestion	
dilution 1/10 dans solution formamide/400HD ROX	Applied Biosystems
Analyse séquenceur automatique	ABI PRISM 3130xl, plateforme Ouest Génopole

Pour s'assurer de la présence réelle de chaque fragment terminal de restriction (T-RF), les analyses sont réalisées en réplicats. Ainsi, à partir de chaque ARN extrait, deux RT-PCRs sont réalisées et chaque produit d'amplification est ensuite traité identiquement selon le tableau II-5. Seuls les T-RFs présents dans les deux réplicats sont pris en compte pour l'analyse des données.

A partir de l'analyse des T-RFs, deux informations peuvent être traitées, la taille des T-RFs (paire de bases) et leur importance (fluorescence). Néanmoins, l'analyse comparée des réplicats nous a montré que dans notre cas, l'importance des T-RFs n'est pas conservée entre réplicats. C'est-à-dire que dans des réplicats, la hauteur de pic d'un même T-RF peut varier significativement. Cela peut être dû à des différences d'efficacité entre les deux RT-PCRs ou entre les restrictions. Nous avons aussi constaté des variations importantes entre capillaires sur le séquenceur automatique utilisé (ABI3730xl). Ainsi, dans notre étude seule la taille des T-RFs est prise en compte.

Les tailles des T-RFs sont codées comme des variables discrètes (présence/absence d'un fragment) afin de réaliser un traitement statistique. En l'occurrence, des approches de type (i) ACP (Quinn and Keough, 2002; Vandenkoornhuyse et al., 2003), (ii) parcimonie maximale (Vandenkoornhuyse et al., 2003), permettent une analyse fine des données (comparaison de communautés). L'utilisation combinée de ces deux approches permet d'augmenter la

robustesse des interprétations (Losos, 1996; Vandenkoornhuyse et al., 2002). La comparaison de la structure de communautés est réalisée par une procédure de parcimonie maximale avec le logiciel PAUP 4.0 β 10. Pour l'analyse de parcimonie, une recherche heuristique avec un réarrangement des branches par scissions des sous-arbres et reconnections (procédure TBR) a été utilisée pour trouver l'arbre le plus court. L'addition des séquences étant réalisée par tirage aléatoire avec 500 répliquats. Les valeurs de Bootstrap (technique de simulation pour tester la robustesse des nœuds basée sur la création de jeux de données artificiels produits par pseudo ré-échantillonnage, tirage de colonnes avec remise) sont estimées à partir de 1000 répliquats.

4.4. Clonage et séquençage

Les différentes étapes permettant de cloner un produit d'amplification sont brièvement présentées dans le tableau II-6.

Tableau II-6 : Résumé des étapes de clonage de produit de PCR

Étapes	Matériels et fournisseurs
PCR	
Purification produits de PCR	High Pure PCR Product Purification Kit, Roche
Overhanging (optionel), 72°C 20 min	Taq Polymerase (Applied Biosystems), dATP (Promega)
Ligation, une nuit 4°C	pGEM-T (Promega), T4 DNA Ligase (Invitrogen)
Transformation, 30 min sur glace, 1 min 15 42°C et 2 min sur glace	<i>Escherichia coli</i> DH5 α (Invitrogen)
Croissance, étalement et criblage	LB + agar bactériologique + ampicilline (125 mg.L ⁻¹) + X-Gal (20 mg.L ⁻¹) + IPTG (0.1 mM)

Les clones positifs récupérés après criblage sont mis en culture une nuit à 37°C dans du milieu de culture Luria Bertani (LB). La présence et la taille du fragment inséré sont vérifiées par PCR avec les amorces T7 et SP6 correspondant à des séquences portées sur le plasmide de part et d'autre du site d'insertion (tableau II-4) puis migration du produit d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Les produits d'amplification de taille attendue sont séquencés par la méthode de Sanger sur un séquenceur automatique ABI3730xl.

4.5. Analyse des séquences, arbres phylogénétique et parcimonie maximale

Les séquences des brins sens et anti-sens sont assemblées avec Sequencher 4.5 (GeneCodes) et vérifiées une par une. Puis, chaque séquence est comparée aux séquences contenues dans la base de donnée de la banque de gènes internationale par analyse d'alignement local BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide) sur le site du NCBI (Altschul et al., 1997). Un alignement global et multiple du jeu de séquences obtenu

(séquences environnementales + meilleurs BLASTn + séquences de microorganismes de référence) est réalisé avec CLUSTAL-X 1.81 (Thompson et al., 1997) puis optimisé à l'œil. La présence de chimères générées par l'amplification par PCR est vérifiée avec le principe des plus proches voisins en utilisant l'application *CHIMERA CHECK* qui est un outil d'analyse de Ribosomal Database Project II (RDP) (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>, Maidak et al., 1999).

Les matrices de données étant importantes, des algorithmes approchés (heuristiques) sont utilisés pour permettre l'obtention d'un résultat en un temps de calcul raisonnable. Ces algorithmes trouvent soit le meilleur arbre, soit une topologie voisine de la topologie optimale. Les autres méthodes (NJ-K2P et ML, voir ci-dessous) ne nécessitent pas une approche heuristique.

L'analyse phylogénétique des séquences est réalisée par trois méthodes avec à chaque fois un calcul de bootstrap pour estimer la robustesse de la phylogénie:

- Neighbor-Joining, méthode de clusterisation relaxant l'hypothèse d'horloge moléculaire des méthodes d'UPGMA en utilisant le modèle de distance de Kimura à 2 paramètres (pondération des transition par rapport aux transversions) en utilisant CLUSTAL-X 1.81.
- Maximum de parcimonie, méthode basée sur le calcul du nombre de pas nécessaires pour une construction donnée, l'arbre le plus court étant celui qui est retenu. Les matrices de données étant importantes en taille (nombre de lignes), des algorithmes approchés (heuristiques) sont utilisés en maximum de parcimonie pour permettre l'obtention d'un résultat en un temps de calcul raisonnable. Ces algorithmes trouvent une topologie voisine sinon la topologie optimale (addition de séquences aléatoire, procédure de réarrangement des branches TBR) (dans PAUP 4.0 β 10) (annexe 2).
- Maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood), méthode très robuste de calcul de phylogénie consistant à analyser par rapport à un modèle de distance choisi la meilleure solution probabiliste de reconstruction. Le résultat obtenu par cette méthode dépend donc de manière implicite du modèle de distance choisi. Pour choisir le plus judicieusement possible le modèle, l'outil Modeltest 3.7 (Posada and Crandall, 1998) est utilisé. Il permet de tester contre le jeu à analyser 56 modèles différents. Tous ces calculs sont réalisés en utilisant PAUP 4.0 β 10. (annexe 3)

Les phylogénies obtenues par ces trois méthodes sont comparées pour vérifier la congruence des topologies et relever les incertitudes. Les arbres obtenus à partir des données

de séquences de bactéries sont enracinés en choisissant comme ‘outgroup’ un Crenarchaeota (AJ347774).

5. Mise en place du Stable Isotope Probing à partir d'ARN

5.1. Principes et particularités de la technique

La technique de SIP est présentée dans la figure II-9. Brièvement, un substrat marqué avec un isotope stable (^{13}C dans notre cas) est apporté à des communautés microbiennes. Les microorganismes actifs dans la dégradation de ce substrat vont incorporer l'isotope stable dans leurs acides nucléiques (ARN dans notre cas) qui, après extraction, pourront être séparés des acides nucléiques non marqués (provenant des microorganismes qui ne sont pas intervenus dans la dégradation du substrat) par ultracentrifugation. Cette technique donne ainsi accès à la diversité des microorganismes actifs dans la dégradation d'un substrat spécifique.

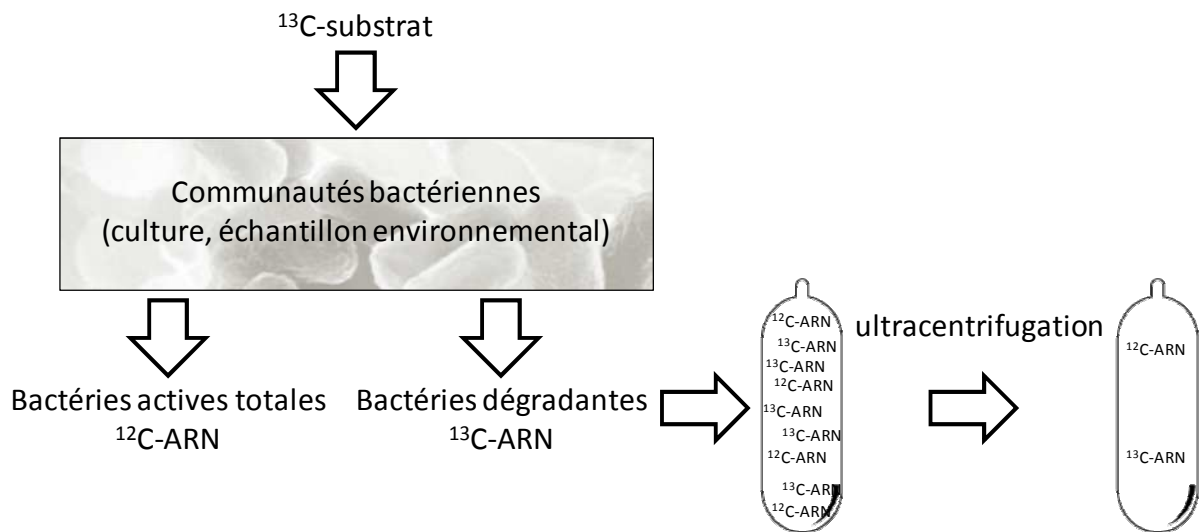


Figure II-9 : Principe de la technique SIP-ARN

L'étape d'ultracentrifugation est primordiale pour l'établissement du gradient isopycnique (gradient de densité à l'équilibre) et une bonne séparation des ARN marqués et non marqués. Cela se traduit par une efficacité de rotors et différents paramètres entrent en jeu (figure II-10):

- la vitesse maximum de rotation et le rayon maximum (r_{max}): ces deux paramètres contribuent à la force maximum (en g) générée par le rotor.

- le rayon minimum (r_{\min}): détermine la force centrifuge qui s'exerce sur les particules situées en haut du tube, plus r_{\min} est élevé, plus la force centrifuge en haut du tube est importante et plus la séparation sera rapide.
- le 'pathlength' (distance à parcourir) : c'est la différence entre le rayon minimum et le rayon maximum, plus le 'pathlength' est court, moins la particule aura de distance à parcourir pour culoter contre la paroi du tube. Le 'pathlength' dépend de l'angle d'inclinaison du tube dans le rotor, plus cet angle est aigu, moins le 'pathlength' est grand.

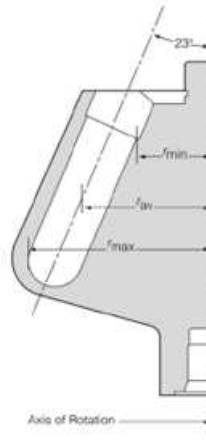


Figure II-10 : ensemble des caractéristiques du rotor à prendre en compte pour l'ultracentrifugation

L'ensemble de ces paramètres est pris en compte dans l'efficacité globale d'un rotor qui est déterminée par le calcul d'un facteur k : $k = (2.53 \times 10^5 \times \ln(r_{\max}/r_{\min})) / (\text{rpm}/1000)^2$

Ainsi, quand le facteur k diminue, l'efficacité du rotor augmente et la séparation est plus rapide. Ce facteur k permet également de transposer des conditions de centrifugation entre deux rotors grâce à la formule : $t_{\text{rotor1}} \times k_{\text{rotor1}} = t_{\text{rotor2}} \times k_{\text{rotor2}}$, avec t le temps de centrifugation.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons utilisé le rotor Ti90 (Beckman-Coulter) avec des tubes de 13.5 mL et une vitesse de centrifugation de 45000 rpm ce qui correspond à un facteur k de 100.7. Après 48 h d'ultracentrifugation, nous avons pu mesurer le gradient isopycnique établit (figure II-11).

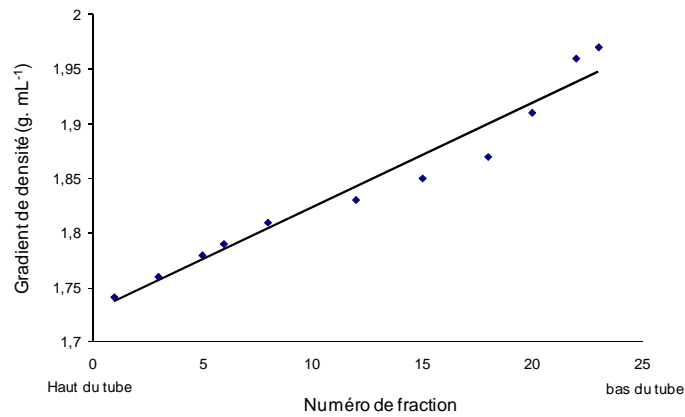


Figure II-11 : Gradient de densité établi dans nos conditions d'ultracentrifugation, moyenne de 6 mesures indépendantes

5.2. Mise au point en conditions optimales

Afin de maîtriser la technique et de bien discerner les fractions légères et lourdes dans le gradient d'ultracentrifugation, nous nous sommes placés dans des conditions optimales pour l'incorporation des carbones du substrat dans les ARNs bactériens. Pour cela, 1 g de sol d'Epoisses est placé en suspension dans 10 ml de milieu de culture minimum (Topp et al., 2000b) avec comme seule source de carbone du ¹²C-glucose ou du ¹³C-glucose (0.2 g.L⁻¹). Ces cultures de sol sont placées sous agitation (150 rpm) à 30°C. Après 24 h, 3 ml sont prélevés, centrifugés 5 min à 10000 rpm et les ARNs sont extraits du culot obtenu selon le protocole présenté tableau II-7 (Courty et al., soumis).

Tableau II-7 : Protocole d'extraction d'ARN de sol (Courty et al., soumis)

Lyse cellulaire	culot + 200 µl H ₂ O DEPC 1 h à -80°C 500 mg billes de verre 106 µm 33.3 µl SDS 20 % 167 µl solution diatomées (1.24 g dans 40 ml H ₂ O DEPC) 583 µl de Tris buffered phenol vibrobroyage 1600 rpm 2 min 30 sec
Extraction acides nucleiques	centrifugation 14000 g 10 min 4°C → surnageant 36.7 µl de NaAcétate 3M 478 µl ethanol 100 % 1 nuit -20°C centrifugation 14000 g 10 min 4°C → culot lavage ethanol 70% repris dans 25 µL H ₂ O DEPC
Purification ARN	RNA:DNA MiniKit (Qiagen) Rneasy Plant MiniKit, protocole RNA Cleanup (Qiagen)

Les ARNs extraits sont quantifiés par mesure de l'absorbance à 280 nm et 50 ng sont utilisés pour l'ultracentrifugation (48 h, 45000 rpm) dans du trifluoroacétate de césium (CsTFA 2 g.mL⁻¹, Amersham Biosciences). Les tubes sont ensuite délicatement récupérés, fixés sur une potence et, à l'aide d'un guide, 23 fractions sont prélevées à la seringue tout le long du tube (figure II-12). Les ARNs contenus dans chaque fraction sont précipités et des RT-PCRs ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S (amorces EUB_519f et EUB_1390r, tableau 4) sont réalisées sur les 23 fractions. Les résultats obtenus montrent que les ARNs extraits des cultures de sol contenant du ¹²C-glucose sont présents dans les fractions supérieures 1 à 13 alors que les ARNs issus des cultures de sol contenant du ¹³C-glucose sont détectés sur l'ensemble des 23 fractions du gradient. Suite à ces résultats nous avons décidé de prélever deux fractions caractéristiques des ARNs non marqués (¹²C-ARN) et des ARNs marqués (¹³C-ARN), soit les fractions 10 (1.83 g.mL⁻¹) et 17 (1.9 g.mL⁻¹), respectivement.



Figure II-12 : A. prélèvement des fractions le long du gradient d'ultracentrifugation, B. guide pour le prélèvement des 23 fractions le long du gradient d'ultracentrifugation

5.3. Mise au point sur sol avec l'atrazine

5.3.1. Détermination de la quantité d'atrazine à apporter

Dans le cas d'une molécule complexe telle que l'atrazine, la maîtrise de la technique de SIP à partir d'ARN repose sur deux paramètres qui sont particulièrement importants à définir : le choix du marquage de la molécule et les quantités de ¹³C et donc de molécule marquée à apporter.

Quelle quantité de ^{13}C apporter pour du SIP à partir d'ARN extrait de sol ?

La quantité d'atrazine à apporter à nos échantillons de sol a été déterminée d'après les travaux de Lueders et al. (2004), seule publication traitant de SIP à partir d'ARN extrait de sol qui était disponible au début de nos travaux. En vaporisant du $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ dans des fioles de verre contenant des suspensions de sol (sol de rizière, 50 g en poids sec), cette étude a permis l'identification des microorganismes méthylophiles présents et actifs. Après 42 jours d'incubation à 25°C, 30.5 mmol de $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ étaient incorporées par le sol et 27.3 mmol de $^{13}\text{CO}_2$ étaient récupérées dans les pièges à CO_2 , 52.77 % du ^{13}C apporté sous forme de $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ gazeux se retrouvait donc incorporé dans le sol et potentiellement dans la biomasse microbienne. Le taux d'assimilation de ^{13}C par le sol est donc de 28 μmol de ^{13}C par g de sol sec et par jour, ce qui représente 52.77 % de l'apport initial. Ce premier paramètre a été retenue pour notre étude.

Quel marquage de l'atrazine utiliser ?

En se basant sur la bibliographie disponible (Radosevich et al., 1996; Rousseaux et al., 2001) nous avons opté pour un marquage sur les chaînes carbonées latérales de la molécule et non sur son cycle. En effet, les carbones du cycle sont plus rapidement minéralisés que ceux des chaînes ce qui laisse penser que les carbones des chaînes sont préférentiellement incorporés dans la biomasse microbienne. Cette différence de minéralisation a été confirmée dans nos expérimentations (figure II-13).

Comme Radosevich et al. (1996), nous avons trouvé 33 % moins de $^{14}\text{C-CO}_2$ issus de l'atrazine lorsque la molécule était marquée sur les chaînes par rapport à un marquage sur le cycle, nous avons ainsi supposé que ces 33 % de carbones manquant avaient été incorporés dans la biomasse microbienne du sol.

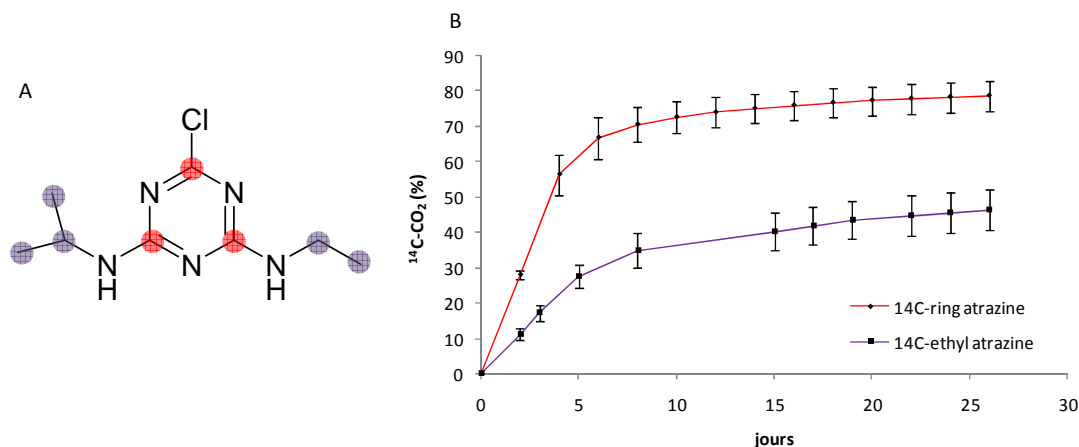


Figure II-13: A. Molécule d'atrazine et les carbones marqués pour la minéralisation, B. Minéralisation de l'atrazine avec le marquage ^{14}C sur les chaînes ou sur le cycle.

Quelle quantité de ^{13}C -éthyl atrazine apporter pour du SIP à partir d'ARN extrait de sol ?

Afin d'éviter les biais liés notamment au 'cross feeding', nous avons choisit de nous baser sur des temps d'incubation courts, soit 13 jours pour l'étude de la consommation de l'atrazine dans notre sol d'Epoisses. Ainsi, en 13 jours, dans les conditions de Lueders et al. (2004), le taux d'assimilation est de $13 \times 28 \mu\text{mol} = 0.36 \text{ mmol}$ de ^{13}C par g de sol sec. Néanmoins cette quantité correspond à un pourcentage d'assimilation dans la biomasse microbienne de 52.77 % de l'apport initial alors que pour l'atrazine le pourcentage d'assimilation dans la biomasse microbienne a été estimé à 33 %. Il faut donc appliquer un facteur correctif pour se placer dans les mêmes conditions puisque l'atrazine est assimilée par la biomasse microbienne du sol 1.6 fois moins bien que le méthanol. Ainsi, la quantité d'atrazine à apporter pour 13 jours d'incubation est de : $0.36 \times 1.6 = 0.576 \text{ mmol}$ de ^{13}C par g de sol sec. Si l'atrazine est marquée au ^{13}C sur les 5 carbones des chaînes éthyles, il faut donc apporter 0.115 mmol d'atrazine par g de sol sec soit 25 mg d'atrazine par g de sol sec (masse molaire atrazine = 215 g.mol^{-1}).

Quelle est la toxicité de l'atrazine appliquée à forte concentration dans le sol ?

Les quantités d'atrazine normalement appliquées au champ sont de 1.5 mg par kg de sol sec, la quantité calculée ci-dessus (25 mg d'atrazine par g de sol sec) représente donc 10^4 fois plus. Nous avons voulu nous assurer de la bonne réaction du sol suite à l'application d'une telle dose d'atrazine et vérifier que même si il y avait un effet toxique, la dégradation était toujours réalisée. Pour cela nous avons mesuré la respiration du sol et réalisé des cinétiques de minéralisation de ^{14}C -ring atrazine appliquée à 1.5 mg par kg de sol sec et à 25 mg par g de

sol sec à 20°C (figure II-14). Ainsi, appliquée en forte quantité l'atrazine semble avoir un effet négatif sur les communautés microbiennes dégradantes car la minéralisation s'initie plus lentement et est moins rapide (figure 14B). Néanmoins, dans les premiers jours d'incubation, la respiration du sol est identique quelle que soit la quantité d'atrazine apportée. Toutefois, les quantités totales d'atrazine minéralisées lorsqu'elle est appliquée en forte dose sont largement supérieures et on peut supposer que les quantités incorporées dans la biomasse microbienne sont également supérieures. Nous avons donc validé l'utilisation de ^{13}C -éthyl atrazine à une concentration de 25 mg par g de sol sec pour la réalisation du SIP à partir d'ARN extraits de sol.

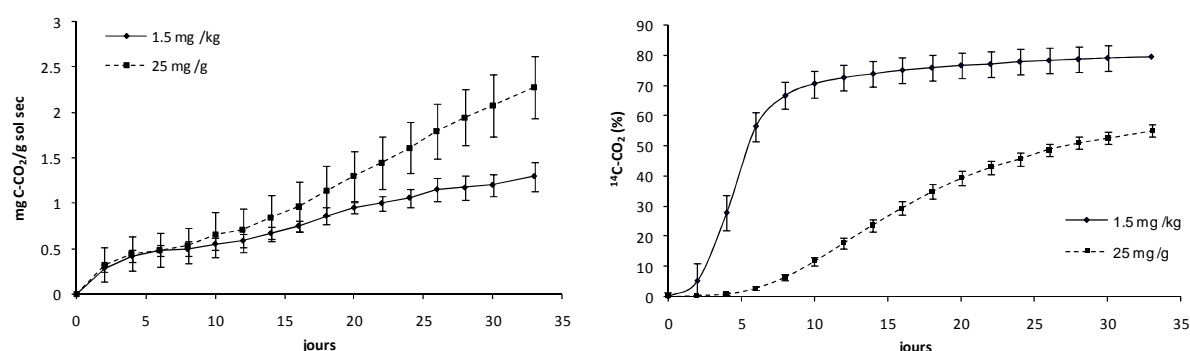


Figure II-14 : A. Respiration du sol, B. minéralisation de ^{14}C -ring atrazine selon la quantité apportée au sol

L'ensemble de ces calculs et de ces expérimentations nous ont permis de valider l'utilisation de 25 mg d'atrazine par gramme de sol sec et le choix du marquage ^{13}C de la molécule sur les chaînes éthyles.

5.3.2. Expérience préliminaire avec ^{14}C -éthyl atrazine

Après avoir déterminé les quantités d'atrazine à apporter au sol pour la réalisation du SIP à partir d'ARN, nous avons voulu savoir à quels temps d'incubation l'incorporation des carbones de l'atrazine dans la biomasse bactérienne était la plus importante. Pour cela nous avons réalisé une expérimentation préliminaire en présence de ^{14}C -éthyl atrazine. Plusieurs analyses ont été effectuées simultanément sur du sol contrôle et des microsites de sol issus de l'activité des lombriciens (paroi de galerie et turricules) afin de se placer dans les conditions les plus proches de celles qui seront appliquées pour l'expérimentation avec le ^{13}C :

Détermination du carbone présent dans la biomasse microbienne dans les trois microsites de sol avant l'apport de ^{14}C -éthyl atrazine (figure II-15). Le ver a un effet négatif

sur la biomasse microbienne du sol (T_0) mais 5 jours après l'apport de 25 mg d'atrazine par g de sol sec la biomasse microbienne s'est équilibrée (diminution dans le sol contrôle et augmentation dans les galeries et les turricules) et il n'y a plus de différence entre microsites de sol (T_5).

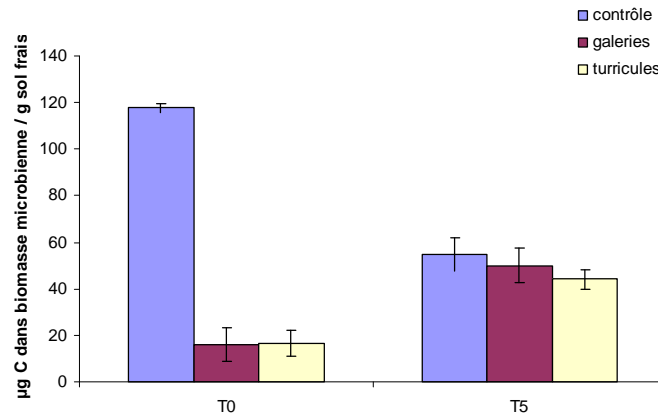


Figure II-15 : Carbone présent dans la biomasse microbienne (C échantillon fumigé – C échantillon non fumigé) avant le début de l'expérimentation (T_0) et 5 jours après l'apport de 25 mg d'atrazine par g de sol sec (T_5).

Suivi de la minéralisation de ^{14}C -éthyl atrazine (25 mg d'atrazine par g de sol sec) à 20°C (figure II-16).

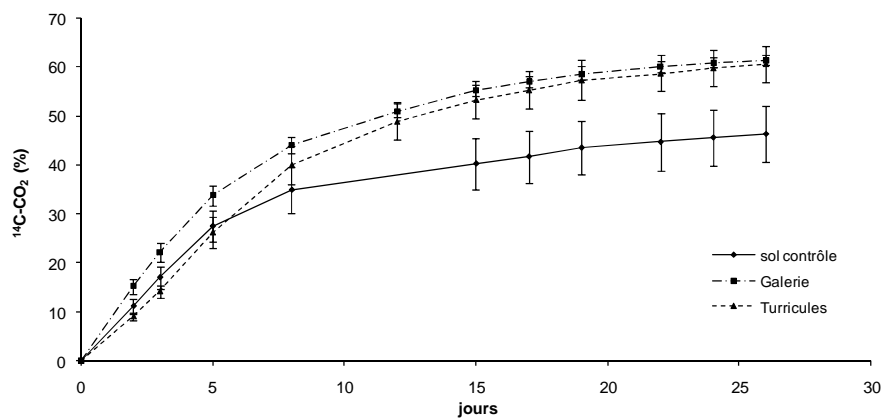


Figure II-16 : minéralisation de ^{14}C -éthyl atrazine dans les différents microsites de sol. Le ^{14}C -éthyl atrazine a été apporté 5 jours après l'atrazine froide pour s'affranchir de la phase de latence observée figure II-14B.

Détermination du ^{14}C dans la biomasse microbienne par la technique de fumigation/extraction. Cette technique permet d'évaluer la biomasse microbienne dans les sols (Jenkinson and Powlson, 1976; Vance et al., 1987). Le principe est d'exposer les bactéries du sol à une atmosphère uniquement composée de chloroforme gazeux ce qui provoque leur mort par lyse cellulaire. Il y a alors libération dans le milieu de molécules organiques carbonées et azotées dont la concentration est proportionnelle à la biomasse

bactérienne de départ. Le dosage de ces molécules via la détermination des teneurs en C organique soluble, en rapport avec un témoin non fumigé, permet d'obtenir la biomasse bactérienne. Brièvement un même échantillon de sol est divisé en deux, l'un est fumigé et l'autre non, il sert de référence (témoin non fumigé). Ainsi 250 mg de sol sont placés dans une coupelle en aluminium dans une enceinte hermétique dans laquelle du chloroforme est vaporisé pendant 24 h (fumigation). Le carbone des échantillons fumigé et non fumigé est extrait sous agitation pendant 1 h avec 10 mL de K_2SO_4 0.5 M et le lysat est filtré consécutivement sur un filtre plissé Durieux puis sur un filtre 0.2 μm . Le C organique est ensuite dosé par oxydation thermique (1010 TOC Analyzer, OI Analytical) et le C organique présent dans la biomasse microbienne est déterminé en calculant la différence entre l'échantillon fumigé et celui non fumigé.

Cette technique s'est avérée problématique avec le ^{14}C -atrazine car à chaque fois (pour chaque prélèvement et chaque microsite), les quantités de ^{14}C retrouvées dans le sol non fumigé étaient supérieures à celles retrouvées dans le sol fumigé c'est à dire après lyse des cellules microbiennes (figure II-17A). Cette perte de radioactivité dans les échantillons fumigés a eu lieu dans l'enceinte de fumigation, puisqu'une forte contamination a été retrouvée sur le joint de la porte ainsi que dans la graisse appliquée. Nous n'avons donc pas pu déterminer à quel moment le carbone issu de l'atrazine se retrouvait dans la biomasse microbienne. Néanmoins ces résultats nous montrent une diminution exponentielle de la quantité de ^{14}C dans le sol avec le temps en parallèlement à la minéralisation de l'atrazine (figures II-16 et II-17).

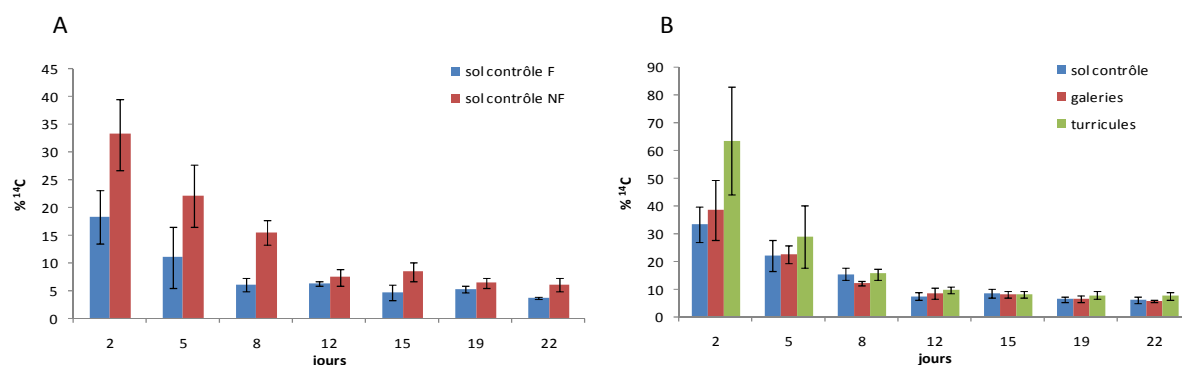


Figure II-17 : A. Pourcentage de ^{14}C retrouvé dans le sol contrôle fumigé et non fumigé, B. Pourcentage de ^{14}C retrouvé dans le sol contrôle, les galeries et les turricules non fumigés

Cette expérimentation ne nous a donc pas indiqué la fenêtre de temps durant laquelle les carbones de l'atrazine se retrouvent dans la biomasse microbienne. Suite à ces résultats, nous avons décidé de réaliser un suivi de la consommation de l'atrazine qui, relié aux

cinétiques de minéralisation déjà obtenues nous permettra de connaître les meilleurs temps d'incubation pour les extractions d'ARN.

5.3.3. Cinétique de dégradation de l'atrazine

La détection et la quantification de l'atrazine et de ses métabolites (DEA, DIA et hydroxyatrazine) dans nos échantillons de sol ont été réalisées par CL/SM au LERES de l'EHESP (Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes, France). Une phase de mise au point a été nécessaire pour adapter le protocole préexistant à des petites quantités de sol (250 mg). Ainsi différents pourcentages d'humidité du sol ont été testés et les meilleurs résultats obtenus, notamment en terme de reproductibilité, correspondaient à un pourcentage d'humidité du sol de 50% qui sera donc utilisé par la suite.

Pour la cinétique de dégradation nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que la future expérimentation en présence de ^{13}C -éthyl atrazine pour le SIP sur ARN de sol. Le sol contrôle a donc été humidifié à 50 % d'humidité, placé à 20°C, prétraité avec 25 mg d'atrazine par g de sol sec et 20 jours plus tard un second traitement de 25 mg d'atrazine par g de sol sec a été réalisé. Les consommations d'atrazine et de ses métabolites ont été suivies dès le prétraitement (figure II-18). Le DIA n'a jamais été détecté et les autres métabolites de l'atrazine (DEA et hydroxyatrazine) ont été détectés de manière sporadique pendant le prétraitement et plus régulièrement après le second traitement. Néanmoins les quantités détectées ont toujours été très faibles, juste au dessus du seuil de détection (au maximum 0.14 et 0.13 mg de DEA et d'hydroxyatrazine respectivement par g de sol sec).

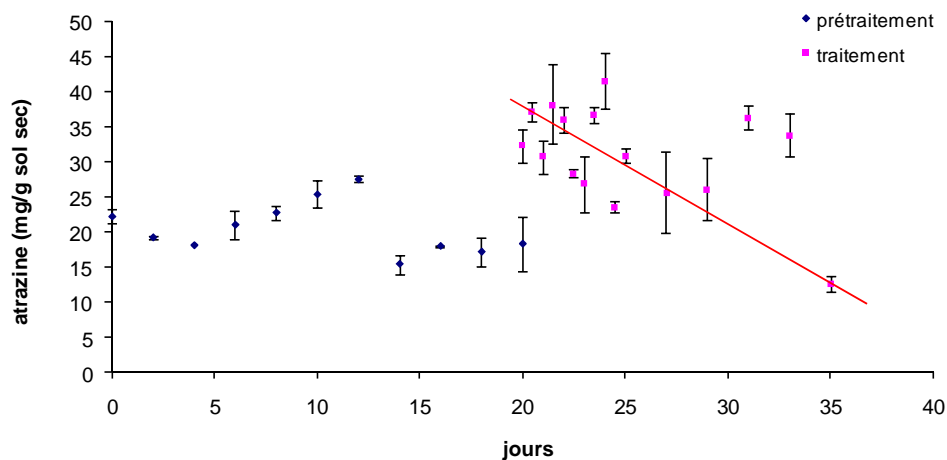


Figure II-18 : suivi de la concentration d'atrazine apportée à T0 (prétraitement) et à 20 jours (traitement).

Ces résultats sont étonnants comparés à ceux obtenus par suivi de la minéralisation puisque les cinétiques sont différentes selon que l'on s'intéresse à la consommation ou à la minéralisation de l'atrazine. Cette étape de mise en place nous a néanmoins permis de mesurer l'importance du prétraitement car la disparition de l'atrazine est plus rapide lors du second apport que lors du premier. A partir de ces résultats nous avons décidé de réaliser les prélèvements pour les extractions d'ARN de sol à 2, 3, 4, 6 et 8 jours suivant le second traitement d'atrazine afin d'avoir accès aux premiers dégradants et d'éviter le 'cross feeding'. La consommation d'atrazine sera mesurée en parallèle pour nous aider à choisir des temps d'incubations optimums pour les extractions d'ARN parmi ces 5 prélèvements réalisés.

6. Traitements statistiques

Selon les données, différents tests statistiques ont été utilisés :

Non paramétriques : test Mann-Whitney (U-test) pour comparer les échantillons deux à deux

Paramétriques : ANOVA à un facteur contrôlé suivie d'un test de Fischer pour tester la réponse des variables à un facteur et identifier les traitements significativement différents et ANOVA en Modèle Linéaire généralisé (GLM) pour tester la réponse des variables à plusieurs facteurs en testant leur interaction.

Des Analyses en Composantes principales (ACP) ont été réalisées pour le traitement et la visualisation graphique des données obtenues suite aux RISA et aux T-RFLP.

Le risque d'erreur est fixé à 5 % quelque soit le test utilisé. L'ensemble des tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Minitab 15.1.1.0 software (Minitab Inc) excepté les GLM réalisés dans l'article 2 'Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil' qui ont été implémentés dans *R* (<http://www.r-project.org/>) (annexe 4). Les ACP ont été réalisées avec le logiciel ADE-4 (Thioulouse et al., 1997). Les régressions linéaires sont réalisées sous Excel.

CHAPITRE III

Rôle de la bioturbation associée à la bioaugmentation sur l'abondance, l'activité et la structure des bactéries indigènes et celles dégradant l'atrazine dans le sol

1. Introduction

Il est actuellement reconnu que les lombriciens modifient les communautés bactériennes du sol néanmoins leur incidence sur la biodégradation de l'atrazine et les bactéries impliquées dans ce processus restent encore très controversés. Les différentes études disponibles dans la littérature montrent des résultats contradictoires possiblement liés à des échelles d'observation différentes (Meharg, 1996; Farenhorst et al., 2000b; Gevao et al., 2001; Binet et al., 2006; Kersante et al., 2006). La bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne est source d'hétérogénéité structurale dans les sols puisqu'elle génère des structures (microsites) différant en termes de porosité, de teneurs en matière organique, en carbone et azote (e.g. Binet and Trehen, 1992; Daniel and Anderson, 1992; Parkin and Berry, 1999; Jegou et al., 2001). Nous nous sommes donc intéressés aux différents microsites issus de la bioturbation du sol par les vers (parois de galeries, contenus digestifs, turricules) en les comparant au sol non bioturbé. A cette échelle il est possible de discerner les impacts positifs ou négatifs des lombriciens sur les communautés bactériennes dégradant l'atrazine en les associant à chaque biostructure.

Ce chapitre III analyse l'impact de la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne associée à la bioaugmentation sur la taille et l'activité des communautés bactériennes indigènes et sur la fraction bactérienne dégradant l'atrazine dans le sol. Dans un premier temps nous avons émis les hypothèses selon lesquelles les lombriciens modifient (i) l'abondance et le devenir de ces bactéries indigènes et dégradantes et (ii) l'activité de minéralisation de l'atrazine. Pour cela les gènes codant l'ARNr 16S et le gène *atzA* ont été quantifiés par qPCR dans du sol non bioturbé et dans différents microsites de sol issus de la bioturbation par les vers de terre (parois de galeries, contenus intestinaux, turricules). Par ailleurs un suivi de la minéralisation de l'atrazine a été effectué simultanément. Le sol de Vezin utilisé pour cette expérimentation étant faiblement capable de minéraliser l'atrazine, l'inoculation de bactéries dégradantes (*Pseudomonas* sp. ADP ou *C. heintzii* possédant respectivement les gènes *atzABCDEF* et *atzABC, trzD*) a également été testé.

Les résultats obtenus à partir de cette première étude nous ont laissé apercevoir les limites de la quantification de gènes (expérimentation à partir d'ADN) et la nécessité de travailler sur l'ARN. Une seconde expérimentation basée sur la quantification de l'ARNr 16S et l'expression des gènes *atzA* et *atzD* a donc été réalisée. L'ARN a été extrait d'un sol non bioturbé et de microsites représentatifs de la bioturbation du sol par les lombriciens (parois de

galeries et turricules) inoculés ou non par la souche *Pseudomonas* sp. ADP dégradant l'atrazine. Cette étude a été réalisée sur les sols de Vezin et d'Epoisses qui diffèrent dans leur capacité à dégrader l'atrazine. L'une des hypothèses explorées est que l'impact de la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne sur l'activité totale et l'activité de dégradation de l'atrazine est différent selon le sol initial. Une cinétique de minéralisation de l'atrazine dans chaque microsite issu des deux sols a également été réalisée en parallèle. Les résultats issus des quantifications d'ARN de cette deuxième expérimentation complètent et expliquent ceux obtenus à partir des ADNs.

Enfin, nous nous sommes intéressé à l'interaction entre la bioturbation et la bioaugmentation, solution potentielle pour la dépollution de sols pollués (Singer et al., 2005). Alors qu'à une échelle globale, Luepromchai et al. (2002) ont montré que la bioturbation du sol par les lombriciens associée à la bioaugmentation stimulait la dégradation des PCBs dans un sol contaminé, nous nous sommes intéressé à cette association à l'échelle des microsites de sols. En effet, à cette échelle, les lombriciens n'ont pas toujours un effet stimulant sur les bactéries inoculées dans le sol (Pedersen and Hendriksen, 1993; Heijnen and Marinissen, 1995). Ainsi, en parallèle des deux expérimentations présentées dans ce chapitre nous avons étudiés l'impact de la bioaugmentation sur la structure des communautés bactériennes (analyses RISA) et sur l'activité des bactéries indigènes et dégradant l'atrazine (quantification de l'ARNr 16S et des ARNm issus des gènes *atzA* et *atzD*) sous contrainte de bioturbation du sol par les lombriciens.

2. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil (article 2)

Cécile MONARD¹, Fabrice MARTIN-LAURENT², Clarisse VECCHIATO¹, André-Jean FRANCEZ¹, Philippe VANDENKOORNHUYSE¹ and Françoise BINET¹

¹CNRS / Université de Rennes, UMR 6553 EcoBio, IFR 2116 / FR 90 CAREN, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 RENNES Cedex, France

²INRA / Université de Bourgogne, UMR Microbiologie et Géochimie des Sols, CMSE-INRA, 17 rue Sully, 21065 Dijon Cedex, France

Re-soumis, acceptation avec révisions mineures à **Soil Biology and Biochemistry**

Abstract

Earthworms, because they change soil physical and chemical properties, are efficient engineers that act on soil microbial community and activity. Thus they may drive pollutant biodegradation in soil such as atrazine mineralization. We hypothesized that earthworms modify the abundance of indigenous soil bacteria and the fate and activity of atrazine-degraders in the soil they engineer by bioturbation. Two bacterial strains: *Pseudomonas* sp. ADP and *Chelatobacter heintzii*, which have acquired the capacity to metabolize atrazine by carrying plasmidic *atz A, B, C, D, E, F* and *atzA, B, C, trzD* genes respectively, were used as bioaugmentation agents. We analyzed the interactions between earthworms (*Lumbricus terrestris*) and the indigenous and atrazine-degrading (indigenous and inoculated) bacterial communities by quantifying the 16S rRNA and the *atzA* gene sequence copies numbers, respectively, in different earthworm microsites. The kinetics of atrazine mineralization were measured to link the bacterial community changes with the degradation function. Digestion by earthworms significantly impacted the number of indigenous bacteria and atrazine mineralization in bioaugmented soils. Regarding the fate of the two atrazine-degraders tested, *Pseudomonas* sp. strain ADP survived better within the 10 days of experiment than *C. heintzii* in the bulk soil but the surviving fraction of *C. heintzii* was still metabolically active and able to mineralize atrazine. A positive “burrow-lining” effect on the *atzA* sequence copies number was observed in soil whether bioaugmented with *C. heintzii* or not (*i.e.* native indigenous *atzA*) thereby indicating that burrow-linings form a specific ‘hot spot’ for atrazine-degraders. The present study is the first to report the role of earthworms in selecting native catabolic key-genes in soil (indigenous *atzA*). This catabolic gene selection through earthworm soil bioturbation could be important in sustaining the degradation (detoxification) function of soil.

Keywords: Atrazine mineralization, *Pseudomonas* sp. ADP, *Chelatobacter heintzii*, Earthworms, *atzA* gene quantification

1. Introduction

Bioturbation refers to the biological reworking of soils and sediments by inhabiting organisms such as plant roots and burrowing animals (Meysman et al., 2006). Earthworms are the predominant component of the soil fauna in temperate soils. They actively cause physical and chemical changes in soil by burying, feeding on organic matter, burrowing and casting that in turn affect the other biological components. Because soil bioturbation affects soil functioning (*i.e.* biogeochemical processes), earthworms are described as efficient ecosystem engineers (Jones et al., 1997).

Bioturbation by the earthworms has been reported to affect the fate of pollutants in soils by changing pollutant mobility and enhancing sorption to the soil matrix (Farenhorst et al., 2000; Binet et al., 2006). Earthworms are also potential providers of hot spots in which microbial activity, specifically the bacterial degrading function, is expected to be higher than in bulk soil (e.g. Binet et al., 1998; Tiunov and Scheu, 2000; Schonholzer et al., 2002; Egert et al., 2004). This is either because the burrowed soil is more favourable for bacterial growth, due to additional C and N resources, or because the bacteria are more widely dispersed and more likely to encounter the substrate to be degraded (Lavelle et al., 2005; Van Elsas and Bailey, 2006). Thus soil bioturbation by earthworms may change the distribution and degradation of organic compounds such as pesticides.

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is an s-triazine herbicide widely used for sorghum and maize crop protection (Smith et al., 2005). Specific soil bacteria, such as *Pseudomonas* sp. YAYA6 (Yanze-Kontchou and Gschwind, 1994), *Ralstonia basilensis* M91-3 (Radosevich et al., 1995), *Pseudaminobacter* sp. C147 and C195 (Topp et al., 2000) and *Chelatobacter heintzii* (Rousseaux et al., 2001) are able to completely mineralize atrazine into CO₂. These strains may serve as agents of bioremediation by bioaugmentation, *i.e.* addition to the soil of laboratory grown microorganisms capable of biodegrading a targeted contaminant (Silva et al., 2004). Soil bioaugmentation associated with earthworm bioturbation may also be relevant in enhancing soil pollutant degradation (Luepromchai et al., 2002). Moreover, indigenous bacteria may play a complementary role in the degradation process by supplying other genes that are involved in alternative and/or additional degradation pathways.

Although soil bacteria degraders are important in degrading atrazine, their relationships with the soil macrofauna are poorly documented. The effects of earthworms on

atrazine mineralization remain unclear, with some published studies reporting enhanced mineralization (Meharg, 1996; Gevaio et al., 2001) and others showing reduced degradation (Farenhorst et al., 2000; Binet et al., 2006). Changes in atrazine mineralization may result from the control exerted by earthworms on soil bacteria, as recently proposed by Kersante et al. (2006).

The main objective of our studies was to understand the way in which soil bioturbation by earthworm impacts the indigenous and inoculated atrazine-degraders. We hypothesized that earthworms modify the abundance of indigenous soil bacteria and the fate and activity of atrazine-degraders in the soil they engineer by bioturbation. Two bacterial strains were used as bioaugmentation agents: (i) *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995), which harbors the six enzymes involved in atrazine degradation encoded by *atzA*, *B*, *C*, *D*, *E* and *F* genes (de Souza et al., 1998a) and (ii) *C. heintzii*, which carries the first three *atzA*, *-B* and *-C* genes and the *trzD* gene (Rousseaux et al., 2001). The *atzA* gene was targeted by qPCR as this key-gene encodes atrazine chlorohydrolase and permits dechlorination of atrazine which is an obligatory step for its complete mineralization (Wackett et al., 2002; Smith et al., 2005). The 16S rRNA genes copies number was also estimated by qPCR to compare the number of indigenous bacteria in the soil and in *L. terrestris* microsites. Changes in the bacterial community in relation to the atrazine mineralization were compared by measuring ^{14}C -atrazine degradation into $^{14}\text{CO}_2$ in bioaugmented and/or bioturbated soil.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Atrazine (chemical purity 99%, Pestanal, Riedel-de Haen) and [*ring*-U- ^{14}C] atrazine (specific activity, 910 MBq.mmol $^{-1}$, radiochemical purity, 98%) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.2. Soil

Soil was collected in Spring 2004 from the top 0-30 cm horizon at an agricultural field site of the Institut National de Recherche en Agronomie (Vézin-Le-Coquet, Brittany, France). The field site had been cropped with maize/leguminous annual rotation since 1993

and thus the soil had been regularly treated with atrazine until 2003, at the time its use became forbidden in France. This soil was a silt loam (sand 11%, silt 74%, clay 15%, pH 6.4) with an organic matter content of 1.8%. The collected fresh soil was sieved at 4 mm, stored at 4°C and used after less than one week. The soil moisture content was 0.22 g of water per g of dry soil (105°C).

2.3. Bacterial strains and culture media

Pseudomonas sp. strain ADP and *C. heintzii* were cultured on solid atrazine medium, and a single colony was used to inoculate all liquid cultures using a 50 ml flask containing 10 ml of atrazine (30 mg l⁻¹ final concentration) medium (AM) (Rousseaux et al., 2001). Cultures were incubated aerobically under rotation (150 rev min⁻¹) at 28°C. The purity of the bacterial cultures was checked by RFLP analyses of the 16S rRNA gene and tested for the presence of *atzA* sequences by PCR. Then, 1 ml of starter culture was used to inoculate 400 ml of tryptone-yeast (TY) medium (5 g l⁻¹ peptones, 3 g l⁻¹ yeast extract, 0.6 mM CaCl₂) in a 1 l flask. Cultures were placed at 28°C under rotation (150 rev min⁻¹). After 15 h of incubation, the cell densities of the bacterial cultures were assessed spectrophotometrically at 600 nm. Bacterial cells were then harvested by centrifugation at 6000 rev min⁻¹ for 10 min. The bacterial pellets were washed twice with a mineral salt 'KNAPP' buffer composed of 1 g l⁻¹ K₂HPO₄, 1 g l⁻¹ KH₂PO₄, 40 mg l⁻¹ MgSO₄·7 H₂O, 4 mg l⁻¹ FeCl₃ (pH 6.6) and resuspended in 300 ml of this KNAPP buffer, corresponding to an inoculum cell density of 8.1 x 10¹¹ colony-forming units (cfu) l⁻¹. These prepared bacteria were used to inoculate the soil microcosms.

2.4. Earthworms

Adult specimens of the species *Lumbricus terrestris* were collected by formalin extraction (e.g. Binet and Le Bayon, 1999) from the same plot as the soil used in the microcosm experiment (see above). They were washed twice in water, placed in soil and fed with maize leaf litter for a one-week acclimation before the experiments were begun. Each microcosm then received three earthworms corresponding to a total average biomass per microcosm of 8.6 +/- 0.2 g. All the earthworms were still alive and active at the end of the experiment (11 days incubation), and the mean weight loss of 0.3 g per microcosm was not significant (U test: $n = 12$, $W=170$, $P = 0.26$).

2.5. Experimental design and soil microcosms preparation

A 3 x 2 factorial design was used for the experiment: soil microcosms (i) without bioaugmentation or bioaugmented with either *Pseudomonas* sp. ADP or *C. heintzii* and (ii) with or without earthworms. In total, 30 microcosms were prepared with 5 replicates of each of the 6 treatments. Soil for bioaugmented microcosms was prepared by spraying the soil uniformly with 30 ml of *Pseudomonas* sp. strain ADP or *C. heintzii* cultures resulting in the inoculation of 1.6×10^7 cfu per gram of dry soil. Non-bioaugmented microcosms were prepared by adding an equivalent volume of 30 ml KNAPP buffer without bacteria. The experimental microcosms were then constructed as described by Binet and Trehen (1992). Each microcosm (PVC cylinder; 15 cm high, 10 cm diameter) was filled with 1520 g of corresponding soil which was compacted to a bulk-density of 1.46 g cm^{-3} (1992). The surface of each soil microcosm was then watered with 75 ml of distilled water to adjust the soil moisture to 0.28 g of water per g of dry soil (105°C). The microcosms were then randomly placed in a climate chamber at 12°C under a 12h:12h night/day photoperiod. After 2 days, worms were placed on the soil surface of the microcosms receiving earthworms and one day later all soil microcosms were treated with 25 ml of an aqueous atrazine solution (28 g l^{-1}) which corresponds to the usual amount applied in the field *i.e.* 1 kg ha^{-1} .

Ten days after atrazine spraying, the soil microcosms were destroyed and representative soil microsites were collected from the microcosms with and without earthworms. Two soil microsites were sampled from the microcosms with earthworms: (i) burrow-linings (BL): the 2 mm thickness of soil carefully collected with a fine spatula from the sides of the entire burrow network, and (ii) surface-casts (SC): the faecal material deposited at the soil surface after 24 h. In addition, two worm microsites (i) midgut contents (MG) and (ii) hindgut contents (HG) were also sampled after dissecting earthworms previously killed by very short immersion (1 sec) in boiling-water. The amount of each soil microsite collected on fresh weight basis was $6.8 \pm 3.8 \text{ g}$ of burrow-linings, $0.7 \pm 0.5 \text{ g}$ of surface casts, $0.7 \pm 0.2 \text{ g}$ of midgut content and $0.7 \pm 0.3 \text{ g}$ of hindgut content. Only bulk soil (BS) was sampled from the microcosms without earthworms where there was no bioturbation. The bulk soil of the treatment without bioaugmentation was defined as control bulk soil. Prior to analysis, the water content of each soil microsite was measured after drying 500 mg of a soil aliquot over night at 105°C.

Each soil microsite was divided into two sub-samples which were used separately (i) to extract DNA in order to quantify the 16S rRNA and *atzA* genes and (ii) to investigate the kinetics of ^{14}C -atrazine mineralization. These soil sub-samples were stored in plastic vials at -20°C until used.

2.6. Soil DNA extraction

DNA was extracted from 250 mg of soil and gut content as described in the MS laboratory method of Martin-Laurent et al. (2001). DNA integrity was checked by electrophoresis on 1% agarose gels and the nucleic acids were quantified, in comparison with DNA standards, using a Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

2.7. Quantification of 16S rRNA and *atzA* in microsites

2.7.1. PCR primers

Two sets of specific primer pairs were used to amplify a fragment of the 16S rRNA gene (341F: 5'CCTACGGGAGGCAGCAG and 515R: 5'TTACCGCGGCTGCTGGCAC) and a fragment of the *atzA* gene (A1-F: 5'ACGGGCGTCAATTCTATGAC and A1-R: 5'CACCCACCTCACCATAGACC) (Devers et al., 2004).

2.7.2. Standard curves

Standard curves relating the number of 16S rRNA or the *atzA* sequence copies number and threshold cycle values (C_t) were generated from serial dilutions of known copies numbers of these 2 genes. C_t was related to the log of the copies number of the targeted gene using the following formula:

$$\text{Log } T_0 = -\log E \times C_t + \log K \quad (1)$$

where E is the PCR efficiency, T_0 is the initial amount of DNA and K is the calculated initial amount of DNA when C_t equals 0.

To perform absolute quantification, cloned fragments were used as qPCR standards. The standards were prepared as follows: cultures of recombinant *E. coli* clones containing a SSU rRNA PCR fragment from a 341F/515R amplification and an *atzA* DNA fragment from an A1-R/A1-F amplification were used to prepare plasmid DNAs by lysing bacterial cells

with a Qiaprep Miniprep kit (Qiagen). The plasmid concentrations were measured with a biophotometer.

2.7.3. Quantitative PCR amplification reaction mixture

Quantitative PCRs were performed using an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) apparatus with QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). The reaction was carried out in a final volume of 25 µl: 12.5 µl of SYBR Green PCR master mix containing 'HotStar' Taq DNA polymerase, 0.3 µM forward primer, 0.3 µM reverse primer, 5 µl of DNA template, 1 µl of T4 gp 32 (QBiogene) and 5 µl of ultrapure water. The thermal cycling conditions for the 16S rRNA sequence amplification consisted of an initial step of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 35 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and 81°C for 15 sec. The last cycle consisted of 15 sec at 95°C, 15 sec at 60°C and 15 sec at 95°C. The thermal cycling conditions for *atzA* quantification were identical except for the initial step which consisted of 10 min at 95°C followed by 40 cycles instead of 35.

The calibration curves were as follows:

$$C_t = -3.68 \times (\text{number of 16S rRNA sequences}) + 44.5 \quad (R^2 = 0.992, n = 21) \quad (2)$$

and

$$C_t = -3.29 \times (\text{number of } atzA \text{ sequences}) + 38.4 \quad (R^2 = 0.996, n = 21) \quad (3)$$

The size of each qPCR product (174 bp and 203 bp for the 16S rRNA and *atzA* genes respectively) was checked by electrophoresis on 2% agarose gel. The absence of inhibitory effects of soil compounds on amplification of *atzA* genes was also checked in additional qPCR controls by adding 0.2×10^3 to 0.2×10^6 *atzA* sequence copies to the different environmental samples (data not shown). A coefficient *K* indicating the proportion of *atzA* sequence copies number in relation to the 16S rRNA sequence copies number (*atzA*/16S rRNA) was calculated (Table 1).

2.8. Specificity of the *atzA* primers

The *atzA* amplifications were performed in the same conditions as described above but without SYBRgreen. PCR products were purified after electrophoresis on 2% agarose gels using a minElute Gel Extraction Kit (Qiagen) and cloned into pGEM-T-Vector (Promega). Up to three clones were sequenced for each microsite, using the BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations and analyzed

using the automatic sequencer ABI3130xl (Applied Biosystems). Sequences were edited using Sequencher 4.6 (Gene Codes Corporation) and submitted to the GenBank database under accession numbers EF110540 to EF110554. The sequences were compared to the nucleotide database by using BLASTn and a multiple alignment was performed to highlight differences between sequences. A phylogenetic reconstruction using the NJ-K2P strategy was done to cluster the detected sequences and check their similarity to the *Pseudomonas* sp. ADP or *C. heintzii atzA* gene (ClustalX 1.81).

2.9. Atrazine-degrading bacterial activity

The potential mineralization of atrazine was measured by radiorespirometric analyses ($^{14}\text{CO}_2$) using ^{14}C -labelled atrazine. Mineralization kinetics were performed on bulk soils and on the two soil microsites generated by earthworms (burrow-linings and casts) in the bioaugmented or non-bioaugmented microcosms. Insufficient soil material from the mid- and hindguts was available for radiorespirometric analyses. Miniaturized experimental systems were used as described by Soulas (1993). Soil samples (0.5 g of dry soil or 0.25 g of casts) were moistened to 23% humidity, treated with 128 Bq of ^{14}C uniformly labeled atrazine ($910 \text{ MBq mmol}^{-1}$), on the basis of 1.5 mg per kg of dry soil and incubated in darkness for 28 days. The $^{14}\text{CO}_2$ output was precipitated on Whatman paper soaked in H_2BaO_2 and after 2h at 80°C the membranes were scanned using phosphor imager (storm[®], Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA). The data were then analyzed with the ImageQuant program (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Ca, USA). Atrazine degradation capacity was expressed as the percentage of ^{14}C detected in the CO_2 in relation to the initial quantity of ^{14}C introduced from labelled atrazine. Also, the initial atrazine mineralization rates were calculated at 3 days. The initial radioactivity was determined after quantification of 25 μL of ^{14}C atrazine stock solution by liquid scintillation counting (Packard Tricarb 1900).

2.10. Statistical analysis

Our qPCR dataset was analyzed using the Generalised Linear Model (GLM) after log transformation of the data. An analysis of deviance from the GLM was performed to assess the impacts of (i) earthworm bioturbation on 16S rRNA and *atzA* sequence copies numbers and (ii) bacterial bioaugmentation on 16S rRNA and *atzA* sequence copies numbers

in the different microsites. All these analyses were carried out using *R* (downloadable from <http://www.r-project.org/>).

Additional non parametric tests, Mann-Whitney tests (U-test, $P < 0.05$) were performed by MINITAB software (version 13.31) to test for significant differences in (i) the number of *atzA* or 16S rRNA genes between microsites within each bioaugmentation treatment and (ii) *K* coefficient changes.

Linear regression analysis was also used to test the relationship between the *atzA* sequence copies number and the mineralization of ^{14}C -labelled atrazine at the beginning of the kinetic studies (day 3), expressed as percentage of the total radioactivity of the initially applied atrazine.

3. Results

3.1. Bacteria in soil microsites

The number of copies of the 16S rRNA sequence in bulk soil, regardless of the bioaugmentation treatment, was approximately 2×10^9 copies per gram of dry soil (Fig. 1). As the number of 16S rRNA genes displayed by sequenced genomes of bacteria ranged from one to fifteen per cell (Fogel et al., 1999; Klappenbach et al., 2001), we estimated that the number of 16S rRNA copies in the soil would correspond to 1.3×10^8 to 2×10^9 bacteria per gram of dry soil.

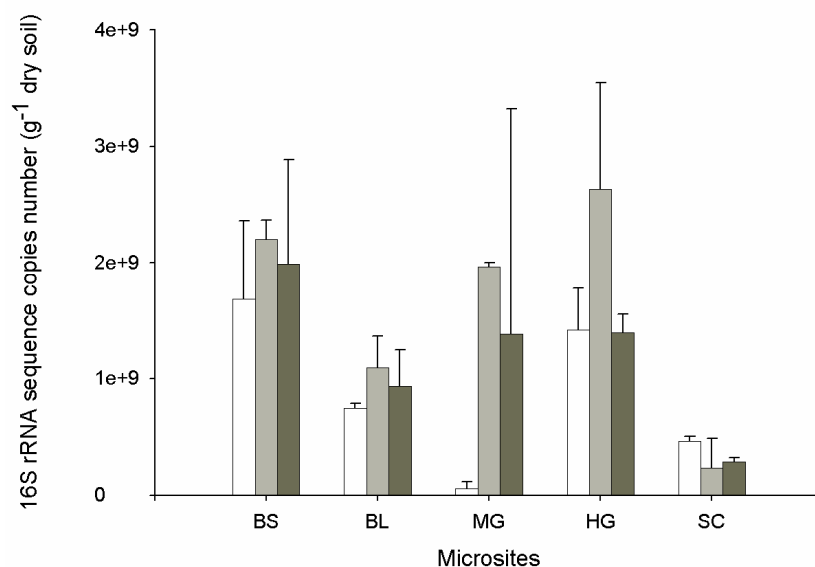


Fig. 1 : 16S rRNA sequence copies number per gram of dry soil determined in bulk soil 'bs' and in earthworm microsites (burrow-linings 'BL', mid- 'MG' and hind-gut 'HG' and surface casts 'SC') without bioaugmentation with an atrazine-degrading strain (white bars), bioaugmented with 1.6×10^7 cfu.g⁻¹ of either *Pseudomonas* sp. strain ADP (light grey) or *C. heintzii* (dark grey). Black bars indicate standard deviations ($n = 5$). Analysis of deviance from the Generalised Linear Model showed a significant impact of microsites, bioaugmentation and their interaction on the 16S rRNA sequence copies number.

We highlighted a negative effect of earthworms on the soil indigenous bacteria in the bulk soil, the burrow-linings and in casts (Mann-Whitney U test: $P < 0.001$) but not in the hindgut (U test: $n = 4$, $W = 6$, $P = 0.413$) compared to the control bulk soil (Fig. 1). Whatever the bioaugmentation treatment, the number of 16S rRNA sequence copies was always the lowest in casts, after earthworm soil digestion. Bioaugmentation with either *Pseudomonas* sp. strain ADP or *C. heintzii* had no significant effect on the initial number of bacteria (U test: $n = 4$, $W = 4$, $P = 0.343$ and $n = 5$, $W = 7$, $P = 0.556$) as the inoculated concentration was 100 times lower than the total number in the original soil (Fig. 1).

3.2. Specificity of *atzA* primers and diversity of *atzA* genes.

The specificity of the primers used for *atzA* gene quantification was checked by sequencing of amplicons. The best hit of blast searches showed that all the sequences were *atzA* sequences. They exhibited 99.1% to 100% of homology compared to known sequences which was in agreement with a previous study by De Souza and colleagues (de Souza et al., 1998b). The sequence alignment demonstrated that we had amplified both incorporated genes

from inocula and a non-negligible proportion of endemic *atzA* genes (5 out of 15 sequences) which differed from those added to soil by at least one nucleotide (data not shown).

3.3. Impact of earthworms on atrazine-degraders

In non-bioaugmented soil the amounts of *atzA* genes were significantly enhanced in burrow-linings (13 times higher than in the control bulk soil on dry weight basis) but unchanged in casts. The number of *atzA* genes was the lowest in gut (only 446 and 277 copies of *atzA* gene per g of dry soil on average in the midgut and hindgut respectively) (Fig. 2). Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain ADP, contrary to bioaugmentation with *C. heintzii*, enhanced the *atzA* sequence copies number in the bulk soil although both were inoculated at the same concentration. The bulk soil in the microcosm bioaugmented with *Pseudomonas* sp. strain ADP exhibited 3.8×10^6 copies of *atzA* gene per g of dry soil compared with only 3.7×10^4 copies per g of dry soil in the bulk soil from the microcosm bioaugmented with *C. heintzii*, which closely corresponds to the number of *atzA* genes in the control bulk soil (Fig. 2). The *atzA* sequence copies number in soil bioaugmented with *Pseudomonas* sp. strain ADP decreased in all microsites compared to the bulk soil (Fig. 2, U test: $n = 4$, $W = 20, 16, 16$ and 12 in burrow-linings, midgut, hindgut and casts respectively, $P < 0.001$). Interestingly, a positive “burrow-lining” effect on the *atzA* sequence copies number was observed in soil microcosms that had not received any inoculum (*i.e.* native indigenous *atzA*) or had received *C. heintzii* (Fig. 2, U test: $n = 4$, $W = 10$, $P < 0.05$).

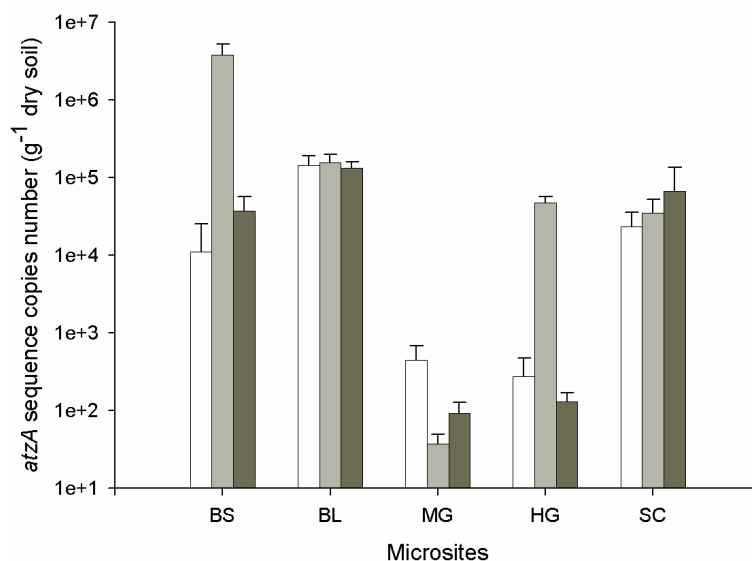


Fig. 2: *atzA* sequence copies number per g of dry soil determined in soil sample in bulk soil bs and in earthworm microsites (burrow-linings 'BL', mid- 'MG' and hind-gut 'HG' and surface casts 'SC') without bioaugmentation with an atrazine-degrading strain (white bars), bioaugmented with 1.6×10^7 cfu.g⁻¹ of either *Pseudomonas* sp. strain ADP (light grey) or *C. heintzii* (dark grey). Black bars indicate standard deviations ($n = 5$). Analysis of deviance from the Generalised Linear Model showed a significant impact of microsites, bioaugmentation and their interaction on *atzA* sequence copies number.

3.4. Proportion of atrazine-degrading bacteria in the indigenous bacteria

After bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain ADP, the proportion of *atzA* genes in relation to 16S rRNA genes in bulk soil was 1698×10^{-6} versus 5×10^{-6} without bioaugmentation, thus 324 times higher (Table 1). Such a high *atzA* increase was not observed after bioaugmentation with *C. heintzii* as K was only 19×10^{-6} . The same proportion of *atzA* genes in relation to 16S rRNA genes was observed in burrow-lining, whatever the treatment (K range from 159×10^{-6} to 185×10^{-6} , Table 1). The lowest K value was most often observed in gut parts, the *atzA* sequence copies number decreasing significantly in this microsite between the three treatments (Table 1, Fig. 2). This pattern was modified after soil excretion as positive *atzA* gene selection was observed in casts but with high variability.

Table 1 : Coefficient (*K*) indicating the ratio of *atzA* sequence copies number in relation to 16S rRNA sequence copies number (*atzA*/16S) in each microsite with or without bioaugmentation. 'BS' bulk soil, 'BL' burrow-linings, 'MG' midgut, 'HG' hindgut and surface casts 'SC'.

Microsites	without bioaugmentation		<i>Pseudomonas</i> sp. strain ADP		<i>Chelatobacter heintzii</i>	
	Average (10^{-6})	SD (10^{-6})	Average (10^{-6})	SD (10^{-6})	Average (10^{-6})	SD (10^{-6})
BS	5.24	4.75	1698.14	655.26	18.58	8.02
BL	184.89	65.18	159.75	85.75	164.24	39.65
MG	22.22	25.69	0.02	0.00	0.15	0.12
HG	0.19	0.13	18.87	4.92	0.08	0.01
SC	52.40	33.40	353.14	283.77	250.26	277.03

3.5. Atrazine mineralization

The amounts of mineralized atrazine in soil microsites that had not received bacterial strains were very low: less than 8% of the initially added atrazine was mineralized after 28 days with initial mineralization rates ranging from 0.9 to 2.7 ng of atrazine per day (Fig. 3). Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain ADP and *C. heintzii* greatly increased atrazine mineralization, except in the casts in which the rate of mineralization was very low (< 1.6 ng of atrazine per day) and the amount of mineralized atrazine did not exceed 4% after 28 days (Fig. 3). Atrazine mineralization was initiated more slowly in the presence of *C. heintzii* than in the presence of *Pseudomonas* sp. strain ADP. For instance, the daily mineralization rates in bulk soil and burrow-linings were 13.9 vs 61.7 and 24.7 vs 36.3 ng of atrazine in presence of *C. heintzii* and *Pseudomonas* sp. strain ADP, respectively. Despite the apparent poor survival of *C. heintzii*, the atrazine mineralization after 28 days was similar to or even higher than that of *Pseudomonas* sp. strain ADP in bulk soil and in earthworm microsites (65% vs 65.9% in bulk soil, 66.3% vs 55.9% in burrow-linings and 2.8% vs 3.9% in casts) (Fig. 3).

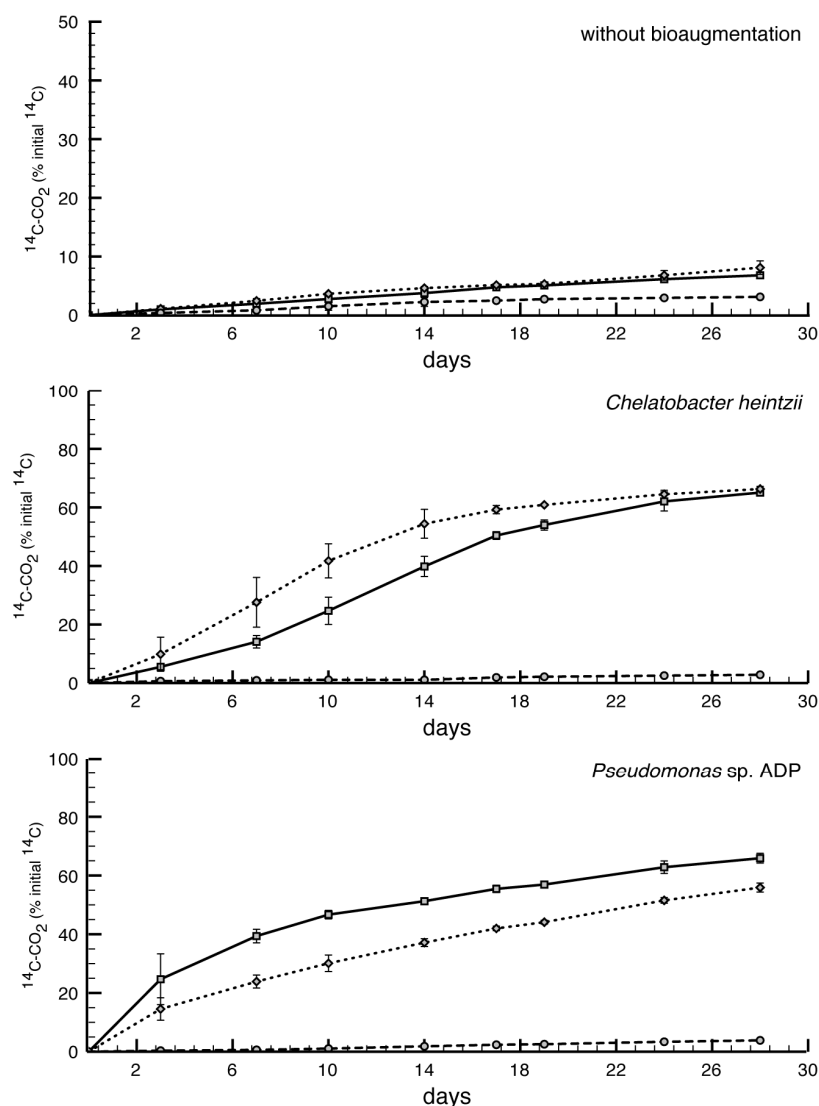


Fig. 3: Mineralization of ^{14}C -atrazine in the various microsites: bulk soil (straight line), burrow-linings (dot line) or casts (dash line) without bioaugmentation and bioaugmented with 1.6×10^7 cfu.g $^{-1}$ of either *Pseudomonas* sp. ADP or *C. heintzii*.

The amount of mineralized atrazine was dependent on the abundance of *atzA* genes in bulk soil ($R^2 = 0.87$, $n = 15$, $P < 0.001$) *i.e.* the basically low *atzA* sequence copies number and atrazine mineralization rate in soil without bioaugmentation were both proportionally enhanced after bioaugmentation. This was not observed in soil burrowed by worms where similar *atzA* sequence copies numbers per g of dry soil in the burrow-linings resulted in different atrazine mineralization rates ($R^2 = 0.16$, $n = 15$, $P > 0.05$).

4. Discussion

By using culture-independent tools such as qPCR, the present study provides evidence of the impact of soil bioturbation by earthworms on the fate of atrazine-degraders and their degrading activity. Soil bioturbation was thus found to sustain spatial heterogeneity in atrazine degradation. This study also brought new insights into the way earthworms drive indigenous soil bacteria.

4.1. Earthworm soil digestion

Earthworms interact with soil bacteria through their feeding activities which generate two kinds of biological interactions: predation, as earthworms may use soil bacteria as a nutrient source (Bohlen and Edwards, 1995) and mutualism, as the soil bacteria benefit from the organic material ingested by earthworms and from the intestinal mucus secreted in the gut (Lavelle and Gilot, 1994; Garvin et al., 2000).

In the absence of bioaugmentation, a decrease of the indigenous bacteria during passage through the earthworm gut was observed in the midgut followed by an increase in the hindgut (Fig. 2). This could be explained by the decreased enzyme content (amylase, protease) (Tillinghast et al., 2001) and the absence of microbicidal activity of the gut fluid in hindgut compared to midgut (Khomyakov et al., 2007).

In casts the *atzA* sequence copies number after bioaugmentation with *C. heintzii* or *Pseudomonas* sp. ADP were 6.6×10^4 and 3.5×10^4 per gram of dry soil respectively but no enhanced mineralization was observed (Figs. 2 and 3). This could be explained either by a negative impact of earthworm soil digestion on the metabolic activity of the two strains or by limited atrazine bioavailability in casts. Enhanced atrazine sorption to the soil that earthworms engineer has been shown to reduce the bioavailability of atrazine to soil microorganisms and in turn to decrease atrazine mineralization (Farenhorst et al., 2000; Binet et al., 2006). Soil ingestion by *L. terrestris* was also observed to reduce the size of the soil *Pseudomonas* sp. ADP population (Kersante et al., 2006). Thus bacterial digestion by earthworms may have reduced bacterial abundance and consequently atrazine mineralization in the casts as no increased mineralization was observed even with bioaugmentation (Fig. 3). Wolter and Scheu (1999) reported that the actual microorganisms were not assimilated by earthworms whereas other authors observed that soil ingestion by *Lumbricus* species reduced the microbial

biomass (Devliegher and Verstraete, 1995) and the abundance of bacterial inoculum (Heijnen and Marinissen, 1995). Our results, derived from culture-independent tools, reinforce the latter hypotheses that *L. terrestris* used the soil microorganisms as nutrient source when the soil organic matter content was low as (i) the number of indigenous bacteria decreased in casts and (ii) no enhanced atrazine mineralization after bioaugmentation was observed after soil digestion (Figs. 1 and 3). Moreover, the high variability in the changes of *atzA* genes in relation to 16S rRNA genes (Table 1) observed in casts likely indicated profound structural modifications within the microbial communities in relation to the microhabitat, as already suggested by Tiunov and Scheu (2000) and Scullion et al. (2003).

4.2. Fate of the two atrazine-degraders tested for bioaugmentation.

Survival of *Pseudomonas* sp. strain ADP in bulk soil, in the short term, was better than that of *C. heintzii* (Fig. 2). We suggest that *C. heintzii* may be less competitive towards indigenous bacteria but the surviving fraction was metabolically active and able to mineralize atrazine. Rousseaux and colleagues (2003) tested different inoculation rates of *C. heintzii* Cit1 in two soils exhibiting poor ability to mineralize atrazine and showed that an increase in atrazine mineralization was obtained with an inoculum density as low as 10^4 cfu.g⁻¹. Based on these results, we suggest that the *atzA* gene copies number found in our experiments should be high enough to explain the enhanced mineralization in bulk soil and burrow-linings.

4.3. Burrow-linings, a special microsite for indigenous atrazine-degraders

According to *atzA* gene sequencing, atrazine degradation in the soil microsites resulted from both indigenous and inoculated atrazine-degraders. The *atzA* gene retrieved from burrow-linings was derived from the indigenous soil bacteria rather than from the inoculated strains as shown by the comparison of *atzA* sequence copies numbers in soil microsites with or without bioaugmentation (Fig. 2). Thus burrow-linings formed a special microsite for indigenous atrazine-degrading strains whereas, strikingly, the number of indigenous 16S rRNA sequences decreased in this microsite (Figs. 1 and 2). The enhanced abundance of *atzA* relative to the 16S rRNA sequence copies number in burrow-linings was consistent with previous observations (Kersante et al. unpublished) showing higher concentration of hydroxyatrazine in burrow-linings compared with bulk soil. Furthermore,

burrow-linings of *L. terrestris* were found to concentrate more atrazine than the bulk soil, due to their higher organic matter content (Farenhorst et al., 2000; Binet et al., 2006). Park et al. (2003) also observed a chemotaxis phenomenon in *Pseudomonas* sp. strain ADP towards atrazine and demonstrated a possible access to sorbed atrazine in organic muck soil. They showed that significantly higher amounts of *Pseudomonas* sp. strain ADP were localized in the vicinity of sorbed atrazine. The aerobic conditions that prevail in burrow-linings would be expected to favor biotic atrazine mineralization (Goswami and Green, 1971; Shapir et al., 1998).

In the present study the *atzA* gene selection did not result in enhanced atrazine mineralization in burrow-linings of the soil without bioaugmentation. This suggests that the atrazine-degrading activity and/or gene expressions of indigenous bacteria harbouring *atzA* were not the same as those of the inoculated strains in this specific microsite. It might be that indigenous bacteria did not harbour the entire atrazine mineralization pathway. Thus the *atzA* sequence copies number did not necessarily reflect the level of mineralization (*e.g.* the *atzA* sequence copies number in burrow-linings in Fig. 2 was not related to the level of mineralization in Fig. 3). Another explanation is that indigenous atrazine-degrading bacteria, unlike the inoculated strains, might not be active or might only express the *atzA* gene at a low level thus displaying a low level of atrazine mineralization. Note that native *atzA* gene selection in burrow-linings in soil bioaugmented with *C. heintzii* resulted in accelerated atrazine mineralization compared to bulk soil. Although further analyses are required, we can speculate that even if *C. heintzii* remained at a low level, the *atzB*, *atzC* and *trzD* harbored by this strain was sufficient to complement the atrazine-degrading pathway of the indigenous strains.

4.4. Conclusions

It is clear from the results presented here that earthworm bioturbation produced profound changes in atrazine-degrading bacteria and atrazine mineralization. A correlation between the amounts of *atzA* genes and mineralization rates was observed in bulk soil but not in soil bioturbated by earthworms. This earthworm effect probably resulted from a combination of (i) the decrease of *atzA* genes harboured by atrazine-degrading strains such as *Pseudomonas* sp. ADP as previously reported by Kersante et al. (2006), (ii) the possible selection of indigenous bacteria harbouring *atzA* genes in the burrow-linings, as shown in the

soil treatment without bioaugmentation (Fig. 2) and (iii) the fact that the *atzA* gene copies number does not provide a direct estimation of the effectiveness of atrazine mineralization. Future work will therefore be focused on transcripts and a RT-qPCR strategy will be used to overcome this problem.

As far as we know, this is the first report to describe the role of earthworms in sustaining native catabolic key-genes in soil (soil indigenous *atzA*). If one considers the large extent of earthworm burrow networks in soil (Kretzschmar, 1982; Edwards et al., 1990; Pitkanen and Nuutinen, 1997) the *atzA* gene selection in earthworm burrow-linings might have consequences on atrazine degradation at the field scale. These results call for a more strategic use of soil bioturbation by earthworms, as soil genoaugmentation, *i.e.* selection of catabolic genes, could be of great importance in sustaining the degradation function as well as in perspectives of bioremediation of atrazine-polluted soils.

Acknowledgements

This work was supported by fundings from the Contrat Plan-Etat Région 2000-2006 to FB and a grant from the council of 'Région Bretagne' to CM and FB. We are also grateful to Pr JS Pierre for helpful advice about the statistical analyses and to Dr D.Warwick for editing the English writing of the manuscript.

References

- Binet, F., Trehen, P., 1992. Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1501-1506.
- Binet, F., Le Bayon, R. C., 1999. Space-time dynamics *in situ* of earthworm casts under temperate cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 85-93.
- Binet, F., Fayolle, L., Pussard, M., Crawford, J. J., Traina, S. J., Tuovinen, O. H., 1998. Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* 27, 79-84.
- Binet, F., Kersante, A., Munier-Lamy, C., Le Bayon, R.-C., Belgy, M.-J., Shipitalo, M. J., 2006. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1255-1263.
- Bohlen, P. J., Edwards, C. A., 1995. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 341-348.
- de Souza, M. L., Wackett, L. P., Sadowsky, M. J., 1998a. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2323-2326.
- de Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P., 1998b. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology* 180, 1951-1954.
- Devers, M., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods* 56, 3-15.
- Devliegher, W., Verstraete, W., 1995. *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: Nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) and their effect on microbial biomass and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 27, 1573-1580.
- Edwards, W. M., Shipitalo, M. J., Owens, L. B., Norton, L. D., 1990. Effect of *Lumbricus terrestris* L. burrows on hydrology of continuous no-till corn fields. *Geoderma* 46, 73-84.

- Egert, M., Marhan, S., Wagner, B., Scheu, S., Friedrich, M. W., 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiology Ecology* 48, 187-197.
- Farenhorst, A., Topp, E., Bowman, B. T., Tomlin, A. D., 2000. Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 23-33.
- Fogel, G. B., Collins, C. R., Li, J., Brunk, C. F., 1999. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microbial Ecology* 38, 93-113.
- Garvin, M. H., Lattaud, C., Trigo, D., Lavelle, P., 2000. Activity of glycolytic enzymes in the gut of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae). *Soil Biology and Biochemistry* 32, 929-934.
- Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K. T., Pearce, T. G., Jones, K. C., 2001. Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environmental Science and Technology* 35, 501-507.
- Goswami, K. P., Green, R. E., 1971. Microbial degradation of the herbicide atrazine and its 2-hydroxy analog in submerged soils. *Environmental Science and Technology* 5, 426-429.
- Heijnen, C. E., Marinissen, J. C. Y., 1995. Survival of bacteria introduced into soil by means of transport by *Lumbricus rubellus*. *Biology and Fertility of Soils* 20, 63-69.
- Jones, C., G., Lawton, J., H., Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* 78, 1946.
- Kersante, A., Martin-Laurent, F., Soulas, G., Binet, F., 2006. Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 57, 192-205.
- Khomyakov, N., Kharin, S., Nechitailo, T., Golyshin, P., Kurakov, A., Byzov, B., Zvyagintsev, D., 2007. Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms. *Microbiology* 76, 45-54.
- Klappenbach, J. A., Saxman, P. R., Cole, J. R., Schmidt, T. M., 2001. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research* 29, 181-184.

- Kretzschmar, A., 1982. description des galeries de vers de terre et variations saisonnières des réseaux (observations en conditions naturelles). *Revue d'Ecologie et Biologie du Sol* 19, 579-591.
- Lavelle, P., Gilot, C., 1994. Priming effects of macroorganisms on microflora: a key process of soil function? In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K. E., (Eds.), *Beyond the biomass*. John Wiley & sons, Chichester, pp. 173-180.
- Lavelle, P., Rouland, C., Diouf, M., Binet, F., Kersante, A., 2005. Regulation of microbial activities in functional domains of roots and invertebrates. In: Buscot, F., Varma, A., (Eds.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. vol. 3. Springer-verlag, Berlin, pp. 291-305.
- Luepromchai, E., Singer, A. C., Yang, C.-H., Crowley, D. E., 2002. Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 41, 191-197.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., Wackett, L. P., 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that Mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1451-1457.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., Catroux, G., 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2354-2359.
- Meharg, A. A., 1996. Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.). *Soil Biology and Biochemistry* 28, 555-559.
- Meysman, F. J. R., Middelburg, J. J., Heip, C. H. R., 2006. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 688-695.
- Park, J.-H., Feng, Y., Ji, P., Voice, T. C., Boyd, S. A., 2003. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3288-3298.
- Pitkanen, J., Nuutinen, V., 1997. Distribution and abundance of burrows formed by *Lumbricus terrestris* L. and *Aporrectodea caliginosa* Sav. in the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 463-467.
- Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y. L., Tuovinen, O. H., 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 297-302.

- Rousseaux, S., Hartmann, A., Soulas, G., 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 211-222.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Lagacherie, B., Piutti, S., Andreux, F., Soulas, G., 2003. Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere* 51, 569-576.
- Schonholzer, F., Hahn, D., Zarda, B., Zeyer, J., 2002. Automated image analysis and in situ hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. *Journal of Microbiological Methods* 48, 53-68.
- Scullion, J., Goodacre, R., Elliott, G., Huang, W., Worgan, H., Gwynn-Jones, D., Griffith, G., Darby, R., Bailey, M., Clegg, C., Draper, J., 2003. Food quality and microbial succession in ageing earthworm casts: standard microbial indices and metabolic fingerprinting: The 7th international symposium on earthworm ecology, Cardiff, Wales, 2002. *Pedobiologia* 47, 888-894.
- Shapir, N., Mandelbaum, R. T., Jacobsen, C. S., 1998. Rapid atrazine mineralization under denitrifying conditions by *Pseudomonas* sp. strain ADP in aquifer sediments. *Environmental Science and Technology* 32, 3789-3792.
- Silva, E., Fialho, A. M., Sa-Correia, I., Burns, R. G., Shaw, L. J., 2004. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. *Environmental Science and Technology* 38, 632-637.
- Smith, D., Alvey, S., Crowley, D. E., 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology* 53, 265-275.
- Soulas, G., 1993. Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 443-449.
- Tillinghast, E. K., O'Donnell, R., Eves, D., Calvert, E., Taylor, J., 2001. Water-soluble luminal contents of the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. and their physiological significance. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 129, 345-353.
- Tiunov, A. V., Scheu, S., 2000. Microbial biomass, biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* L. cast material of different age. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 265-275.

- Topp, E., Zhu, H., Nour, S. M., Houot, S., Lewis, M., Cuppels, D., 2000. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2773-2782.
- Van Elsas, J. D., Bailey, M. J., 2006. Bacterial conjugation in soil. In: Nannipieri, P., Smalla, K., (Eds.), *Nucleic acids and proteins in soil*. vol. 8. Springer-verlag, Berlin, pp. 331-353.
- Wackett, L., Sadowsky, M., Martinez, B., Shapir, N., 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 39-45.
- Wolter, C., Scheu, S., 1999. Changes in bacterial numbers and hyphal lengths during the gut passage through *Lumbricus terrestris* (Lumbricidae, Oligochaeta). *Pedobiologia* 43, 891-900.
- Yanze-Kontchou, C., Gschwind, N., 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4297-4302.

3. Analysis of atz gene expressions during atrazine degradation in soil drilosphère (article 3)

Cécile MONARD¹ et par ordre alphabétique Françoise BINET¹, Marion DEVERS², Oscar LIMA¹, Fabrice MARTIN-LAURENT² et Philippe VANDENKOORNHUYSE¹

¹CNRS / Université de Rennes 1, UMR 6553 Ecobio, IFR 2116 / FR 90 CAREN, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 RENNES cedex, France

²INRA / Université de Bourgogne, UMR Microbiologie des Sols et de l'Environnement, CMSE-INRA, 17 rue de Sully, 21065 Dijon cedex, France

Abstract

Soil is a heterogeneous system with zones of enhanced biological activities called 'hot-spot' that can result from soil bioturbation by roots growth or by inhabiting macrofauna. Soil sustains various services among which pollutant degradation mediated by adapted bacteria. Atrazine constitutes a good model of pesticide contaminating agricultural soil and its biodegradation pathways have been elucidated. The *atzA* gene encodes the enzyme responsible for atrazine dechlorination and the *atzD* gene the enzyme catalyzing the cleavage of the s-triazine ring. The expression of these two genes was investigated during *in situ* degradation of atrazine in soil drilosphère (burrow-linings and surface casts) and in bulk soil of two soils that differed in their ability to mineralize atrazine (Epoisses and Vezin soils able to rapidly and slowly degrade atrazine respectively). Mineralization rates were estimated by quantification of $^{14}\text{CO}_2$ emission from degradation of ^{14}C -atrazine. Interestingly, although *atzA* gene was present in both soils, its expression was not detected. As expected, atrazine mineralization was enhanced in soil microsites from the Epoisses soil where higher levels of *atzD* expression were observed compared to the soil microsites from the Vezin soil. Earthworm impacts on atrazine mineralization depended on the soil as enhanced mineralization was observed in casts from the Epoisses soil but in burrow-linings from the Vezin soil. However, in both cases, consistent higher levels of *atzD* mRNA were quantified in these microsites. The present study underlined the importance of soil heterogeneity in atrazine degradation.

Introduction

Soil is a complex and dynamic system that sustains several functions corresponding to ecological services provided to humankind. Among these main ecological services, natural attenuation of pollutants relying on both the detoxification and the degradation is of prime interest for the environment (Daily *et al.*, 1997; Swift *et al.*, 2004). This soil ability is mainly supported through microbial adaptation to pollutants biodegradation (e.g. Cerniglia, 1992; Radosevich *et al.*, 1995). This microbiological adaptation is thus of main importance as pollutant detoxification and degradation result also in ecosystem resistance and/or resilience.

Atrazine constitutes a good model of pesticide contaminating agricultural soil as it has been used worldwide over the last 50 years. Its biodegradation in soil has been extensively studied and this process has been linked to i) high bacterial diversity through isolation and characterization of numerous atrazine-degrading bacterial strains (e.g. Behki *et al.*, 1993; Yanze-Kontchou & Gschwind, 1994; Mandelbaum *et al.*, 1995; Topp *et al.*, 2000) and degrading bacterial consortia (Alvey & Crowley, 1996; Smith *et al.*, 2005; Martin-Laurent *et al.*, 2006) and ii) detection of *atz* and *trz* genes coding atrazine-degrading enzymes (de Souza *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2001; Mulbry *et al.*, 2002). Among these genes, (i) *atzA* and *trzN* encode the enzyme responsible for atrazine dechlorination, the first step of atrazine degradation, leading to the formation of hydroxyatrazine (de Souza *et al.*, 1996; Mulbry *et al.*, 2002), while (ii) *atzD* and *trzD* genes encode enzymes catalyzing the cleavage of the s-triazine ring which is then quickly metabolized (Eaton & Karns, 1991; Martinez *et al.*, 2001).

However, although atrazine degraders are well described and atrazine-biodegradation potentially well documented, the *in situ* expression of genes involved in atrazine degradation has to be demonstrated in soil. Indeed soil is a heterogeneous system (Ettema & Wardle, 2002) in which bacterial activities, including pesticide degradation, greatly vary in time and space at the field scale, (Walker *et al.*, 2002; Stenrod *et al.*, 2006; El Sebai *et al.*, 2007). Spatial heterogeneity in bacterial activities has often been shown to be related to discontinuities in nutrients resources in soils, with 'hot spots' such as the rhizosphere or the drilosphère (e.g. soil bioturbated by earthworms) harboring higher activities than elsewhere in soil (Nannipieri *et al.*, 2003; Meysman *et al.*, 2006). It has previously been shown that linked to the increase in the bacterial activity, the activity of atrazine degrading communities can be enhanced in the rhizosphere 'hot spot' (Piutti *et al.*, 2002).

As first attempt, DNA-based assays have been used to link atrazine mineralization with degrading gene amounts in soil drilosphère (Kersante et al., 2006; Monard et al., 2008). However a better approach would be to focus on specific gene expression rather than to the genetic potential as mRNA is an indicator of *in situ* activity (Prosser, 2002). Thus, the expression of the *atz* atrazine degrading genes has been quantified by RT-qPCR and related to degradation kinetics in pure culture of two different degrading strains (Devers et al., 2004). Up to date, atrazine degrading gene expression has never been quantified in soil. With the development of effective RNA extraction protocols from soil samples that allows the recovery of high quantities of quality mRNA, *in situ* transcriptional analysis can be now performed. Recently, Leininger et al. (2006) successfully quantified *amoA* cDNA by real time PCR from ammonia-oxidizing bacteria and Archaea in agricultural soil. More recently Nicolaisen et al. (2008) have linked MCPA mineralization to the *tfdA* gene expression in soil bioaugmented a MCPA degrading strain. In line with these recent results, the present study relates atrazine mineralization with the expression of atrazine-degrading genes *atzA* and *atzD* in drilosphère as specific hot spot in soil.

Thus, we first hypothesized that atrazine degrading gene expression depends on whether soil degrades easily atrazine or not, *i.e.* soil bacteria are adapted or not to atrazine mineralization. Regarding the spatial heterogeneity of genes expression in soil, we secondly tested the hypothesis that atrazine gene expression differs among various soil microsites that are closed but spatially independent. Soil microsites generated by earthworm bioturbation were then chosen to perform the transcriptional analysis of atrazine degrading genes.

Materials and methods

Soils

Soils were collected from the upper layer (0-30 cm) of two different agricultural sites of the Institut National de Recherche en Agronomie in France: i) Epoisses (Côte d'Or), a soil with continuous maize crop, treated with atrazine from 1990 to 2000 and able to rapidly mineralize atrazine (Rousseaux et al., 2001) and ii) Vezin (Ille et Vilaine), a soil with rotation maize/bean, treated with atrazine from 1997 to 2003 but that displays a low capacity to mineralize atrazine (Kersante *et al.*, 2006; Monard *et al.*, 2008). Epoisses soil was a clay loam (sand 6.5%, silt 50.3%, clay 43.2%, OM 3.3%) and had a pH of 6.7 while Vezin soil was a silt

loam (sand 11%, silt 74%, clay 15%, OM 1.8%) with a similar pH of 6.4. The collected fresh soils were sieved at 4 mm and stored at 4°C until use.

Determination of the atrazine degradation genetic pool

Before experiments the *atzA*, *atzD*, *trzN* and *trzD* genes were screened in the soils from Epoisses and Vezin by PCR after DNA extraction. The DNA was extracted from 250 mg of each fresh soil using the DNeasy Plant Mini Kit from Qiagen (Qiagen) according to the manufacturer recommendation. PCR were performed in a 25 µl reaction mixture consisted of 4 µl of 10-fold diluted RNA, 2.5 u of *AmpliTaq* DNA polymerase with 1X PCR Buffer (Applied Biosystems, Foster city, CA), 5 nmol of dNTP, 5 pmol of forward and reverse primers (Table 1). The PCR reactions were performed under the following conditions: 94°C for 4 min, 35 cycles of 94°C for 1 min, 1 min at 60°C for the *atzA*, *atzD* and *trzN* amplifications and at 55°C for the *trzD* amplification, 72°C for 2 min, plus an additional 15 min cycle at 72°C. The presence of PCR products was observed by electrophoresis on a 1.5 % agarose gel. Since no *trzN* and *trzD* were detected in the two soils, further analyses by RT-qPCR only targeted the *atzA* and *atzD* genes.

TABLE 1: Sequence of the primer pairs used in this study

Target gene	Primer	Nucleotidic sequence (5'→ 3')	Reference
16S rRNA	341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer <i>et al.</i> 1993
	515r	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	Xia <i>et al.</i> 2000
<i>atzA</i>	Af	ACGGGCGTCAATTCTATGAC	Dever <i>et al.</i> 2004
	Ar	CACCCACCTCACCATAGACC	
<i>atzD</i>	Df	TCCCACCTGACATCACAAAC	Dever <i>et al.</i> 2004
	Dr	GGGTCTCGAGGTTTGATTG	
<i>trzN</i>	trzNf	CACCAGCACCTGTACGAAGG	Martin-Laurent <i>et al.</i> 2006
	trzNr	GATTCGAACCATTCCAAACG	
<i>trzD</i>	trzDf	CCTCGCGTTCAAGGTCTACT	Martin-Laurent <i>et al.</i> 2006
	trzDr	TCGAAGCGATAACTGCATTG	

Soil microcosms

Soil microcosms were prepared as described by Binet and Trehen (1992). Each microcosm (PVC cylinder; 15 cm high, 10 cm) was filled with 4 mm-sieved-fresh soil (water content of 30% w/w) that was compacted to a bulk-density of 1.4 and 1.2 g cm⁻³ for the Vezin and Epoisses soils respectively. Five true microcosm replicates were performed for each soil. The microcosms were placed in a climate chamber at 12°C under a 12h:12h night/day photoperiod and treated with atrazine to simulate a field application rate of 1 kg ha⁻¹. After one day, three

adult specimens of the earthworm species *Lumbricus terrestris* were added on the soil surface with a total average biomass of 10.4 +/- 0.2 g per microcosm. Every two days, earthworm surface casts were harvested and stored à -20°C until use and twelve days after earthworms' addition, soil microcosms were destroyed. The bulk soil not burrowed by earthworms and the burrow-linings corresponding to the 2 mm thickness of soil carefully collected with a fine spatula from the sides of the entire burrow network were sampled and stored à -20°C until use. The whole casts (two days old casts) sampled from the same microcosm were pooled together. Each soil microsite (bulk soil, burrow-linings and casts) was divided in two subsamples: one fraction of 0.5 g to measure atrazine mineralization and the other fraction containing the remainder of soil microsite (from 1.5 to 7.3 g of burrow-linings, from 0.3 to 4.6 g of casts and 10 g of bulk soil) to perform the RNA extractions.

Atrazine mineralization

The potential mineralization of atrazine was measured by radiorespirometric analyses ($^{14}\text{CO}_2$) using ^{14}C -ring labeled atrazine. Mineralization kinetics were performed on bulk soils, burrow-linings and casts from the Vezin and Epoisses soils microcosms. Miniaturized experimental systems were used as described by Soulas (1993). Soil samples (0.5 g) were moistened to 23% humidity, treated with 128 Bq of ^{14}C -labeled atrazine ($910 \text{ MBq mmol}^{-1}$), on the basis of 1.5 mg per kg of dry soil and incubated in darkness for 27 days. The $^{14}\text{CO}_2$ output was precipitated on Whatman paper soaked in H_2BaO_2 and after 2h at 80°C the membranes were scanned using phosphor imager (storm[®], Molecular Dynamics). The data were then analyzed with the ImageQuant program (Molecular Dynamics). Atrazine degradation capacity was expressed as the percentage of ^{14}C detected in the CO_2 in relation to the initial quantity of ^{14}C introduced from labeled atrazine. The initial radioactivity was determined after quantification of 25 μL of ^{14}C atrazine stock solution by liquid scintillation counting (Packard Tricarb 1900).

RNA extraction

While one of the two soil subsamples was treated with ^{14}C -labeled atrazine for the mineralization experiment, the other was at the same time treated with similar amounts of unlabeled atrazine (1.5 mg of per kg of dry soil) to performed total RNAs extractions after different incubation time: i) Prior this unlabeled-atrazine treatment, RNA was extracted from the bulk soil of Epoisses and Vezin soil microcosms to determine the initial expression level

(T₀) and ii) Seven and thirteen days following this second atrazine treatment, RNA was extracted from bulk soil, burrow-linings and casts of the five microcosm replicates from Epoisses and Vezin soils according to Monard et al. (submitted). For each soil sample and sampling date, total RNAs were extracted from two independent extractions of 250 mg of fresh soil and pooled at the end of the procedure to increase the RNA recovered. The RNA pellets were resuspended in 50 µl of ultrapure Dnase- and Rnase-free water. All RNA samples were treated with RNase-free DNase I in presence of RNasin[®] Plus RNase inhibitor (Promega). RNA quantity was calculated from absorption at 260 nm using a spectrophotometer (NanoDrop Technologies).

Reverse transcription

Reverse transcriptions were performed as described by Devers et al. (2004) with 125 ng of RNA. The 515r (Xia et al., 2000), Ar, Dr (Devers *et al.*, 2004) primers were used as reverse primers for the reverse transcription of the 16S rRNA, *atzA* and *atzD* mRNA respectively (table 1). Ten units of AMV-RT and 200 units of MMLV-RT (Promega) were used as reverse transcriptases.

Quantitative PCR

The quantitative PCR were carried out in an ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) apparatus with QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen). The 20 µl reaction mixtures contained 12.5 µl of SYBR Green PCR master mix containing 'HotStar' Taq DNA polymerase, 0.3 µM primers (table 1) for the amplification of the 16S rRNA, *atzA* and *atzD* cDNA respectively, 2 µl of RT products, 1 µl of T4 gp 32 (QBiogene) and 5 µl of ultrapure water. The thermal cycling conditions for the 16S rRNA sequence amplification consisted of an initial step of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 35 cycles at 95°C for 15 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec and 81°C for 15 sec. The last cycle consisted of 15 sec at 95°C, 15 sec at 60°C and 15 sec at 95°C. The thermal cycling conditions for *atzA* and *atzD* quantifications were identical except for the initial step which consisted of 10 min at 95°C followed by 40 cycles instead of 35.

Statistical analysis

The general linear model (GLM) was used to test the significance among differences in gene expression levels, initial mineralization rate (at 3 days) and total amounts of mineralized

atrazine at 27 days between the two soils and the three microsites. Data from each treatment were also compared by a single factor analysis of variance (ANOVA1) followed by a *Post hoc* test carried out with a Fisher's test to identify which treatment were significantly different from which. The minitab 15.1.1.0 software (Minitab Inc.) was used to performed statistical analyses.

Results

Atrazine degradation genetic pool

Among the four genes involved in atrazine degradation expected to be recovered in the two soils, only *atzA* and *atzD* were detected in Epoisses and Vezin soils. However, *atzA* was not expressed in any of the two soils whatever the microsite. To check if this lack of expression was due to a methodological bias, complementary experiments were performed on both soils. They were inoculated with the atrazine degrading strain *Pseudomonas* sp. ADP (1.6×10^7 cfu per g of dry soil) that is known to harbor the *atzA* gene (de Souza *et al.*, 1996). In that particular case, *atzA* expression was detected but at a basal level (data not shown). This indicated that *atzA* gene can potentially be expressed in the two given soils and that our methodological procedure allowed detection of its expression.

Atrazine mineralization activity

Significant differences in atrazine mineralization activity (initial mineralization rate and maximum amounts of mineralized atrazine, Table 2, $P < 0.001$) were observed between Epoisses and Vezin soils while significant differences between soil microsites were only observed for the initial mineralization rate (Table 2, $P < 0.05$).

TABLE 2: General linear modeling of i) the relative number of *atzD* mRNA, ii) the initial atrazine mineralization rate at 3 days and iii) the total atrazine mineralization at 27 days following soil atrazine treatment according to the soil types and microsites.

Factors	number of <i>atzD</i> mRNA per 10^6 16S rRNA				initial mineralization rate				total mineralization at 27 days			
	ddl	Sum of squares	F	P	ddl	Sum of squares	F	P	ddl	Sum of squares	F	P
Soil	1	$0.1 \cdot 10^{-6}$	2.45	0.125	1	2923.37	867.3	0.000	1	19582.2	181.68	0.000
Microsite	2	$1.5 \cdot 10^{-6}$	8.02	0.001	2	27.02	4.03	0.034	2	31	0.16	0.854
Error	41	$3.9 \cdot 10^{-6}$			20	67.08			20	1952.7		
Total	44	$5.5 \cdot 10^{-6}$			23	3017.47			23	20565.8		

Atrazine mineralization in microsites from the Epoisses soil was significantly faster than the ones from the Vezin soil (Fig. 1). Thus, after 27 days of incubation, from 72 to 94% of initially applied atrazine were mineralized in the Epoisses soil microsites whereas only 18 to 36% were mineralized in the Vezin soil microsites (Fig. 1). Initial daily mineralization rates also greatly differed between the two soils and the soil microsites. Thus 180 vs 7, 149 vs 6 and 205 vs 2 ng atrazine were mineralized per day in 0.5 g of bulk soil, burrow-linings and casts of the Epoisses and the Vezin soil respectively. While in the Epoisses soil, the highest and the smallest amounts of mineralized atrazine were observed in casts and in burrow-linings respectively, the opposite was detected in microsites from the Vezin soil, indicating deep changes by soil bioturbation in gene expressions.

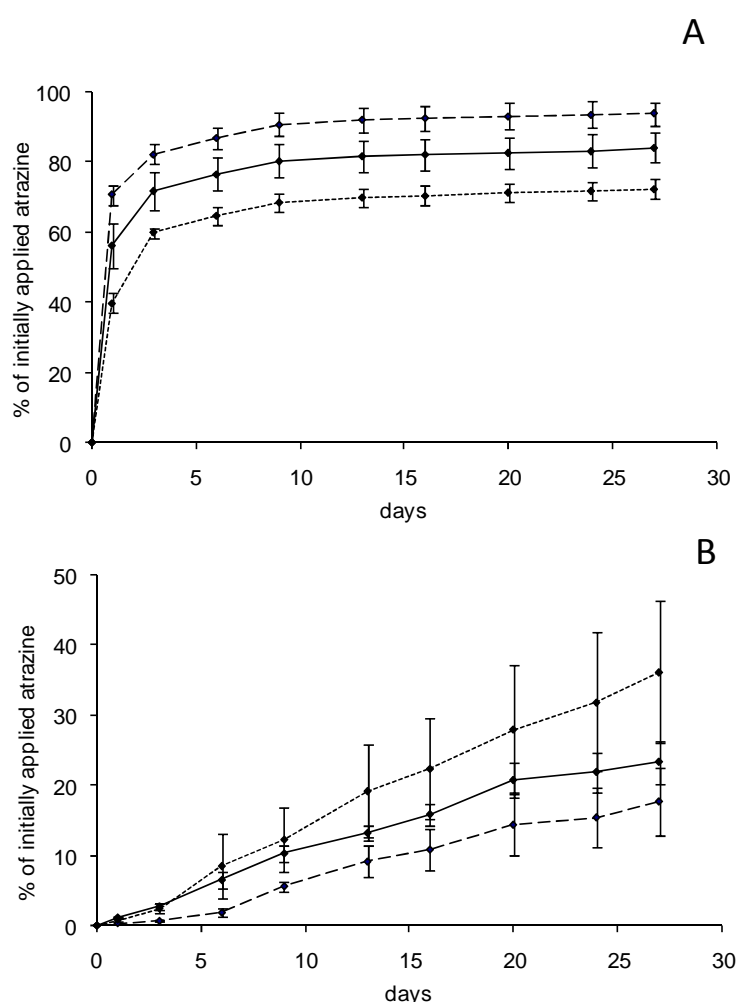


Fig. 1: Kinetics of atrazine mineralization for 27 days following atrazine treatment (expressed as % of initially applied atrazine) from bulk soil (straight line), burrow-linings (dot line) and casts (dash line) from Epoisses (A) and Vezin (B) soil microcosms.

Quantification of 16S rRNA and atzD gene copy number expressions

Among the different soil microsites from the Epoisses and Vezin soils, the quantified 16S rRNA varied from $1.7 \cdot 10^{10}$ to $9 \cdot 10^{12}$ copy number per g of dry soil but the differences were not significant because of the heterogeneity of the replicated measures ($F=2.07$, $P=0.172$, data not shown). The expression of the *atzD* gene did not either varied significantly (from $1.4 \cdot 10^7$ to $9.1 \cdot 10^7$ copy number per g of dry soil) except lower levels of expression in bulk soil from the Vezin soil ($5.1 \cdot 10^5$, $1.53 \cdot 10^6$ and $4.11 \cdot 10^5$ at T_0 , at 7 and 13 days respectively, data not shown). According to these results, the 16S rRNA was used to normalized quantification and the relative amount of *atzD* mRNA was calculated by the ratio: $[\text{atzD mRNA}]/[\text{16S rRNA}]$. This relative amount was expressed as number of copy of *atzD* mRNA per 10^6 16S rRNA.

Expression of atzD in bulk soils with time

Whatever the inoculation time, the *atzD* expression in the bulk soil from Vezin was always lower than the one observed in the bulk soil from Epoisses (Fig. 2). Regarding changes in the expression of *atzD* with time in bulk soils, expression increased to 146 and 49 mRNA per 10^6 16S rRNA at 7 days and then decreased to 46 and 3 mRNA per 10^6 16S rRNA at 13 days in the Epoisses and Vezin soils, respectively (Fig. 2). However all these differences were not significant since the standard deviations were high.

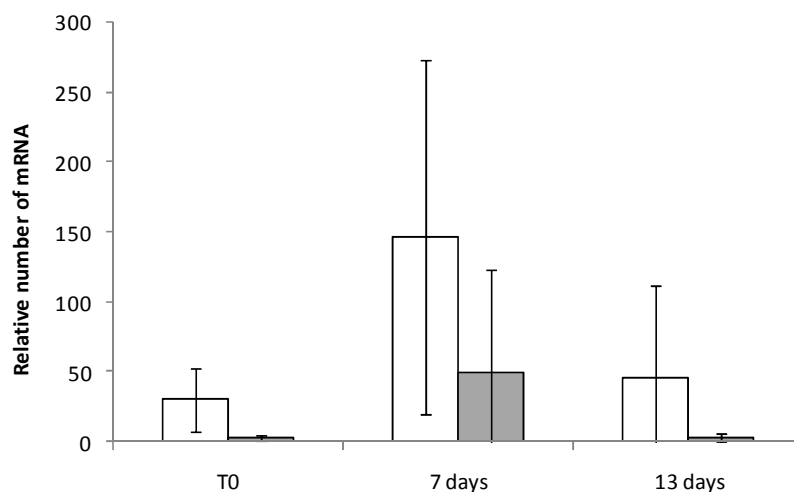


Fig. 2: Relative number of *atzD* mRNA per 10^6 16S rRNA measured in bulk soil from Epoisses (white bars) and in Vezin (grey bars) soil microcosms before atrazine amendment (T_0) and after 7 and 13 days of incubation.

Expression of atzD in soil microsites

Whereas no significant difference in the *atzD* expression between the two soils was observed, *atzD* was significantly differently expressed in the soil microsites (Table 2, $P<0.01$). For

instance, in the Epoisses soil, 7 days after the atrazine treatment, the expression of *atzD* in bulk soil was lower than in burrow-linings and casts (146, 363 and 868 mRNA per 10^6 16S rRNA respectively, Fig. 3A). Irrespective to incubation times, *atzD* expression in burrow-linings and casts was significantly different from the one in bulk soil ($F=9.69$, $P<0.01$ and $F=8.72$, $P<0.05$ respectively, data not shown). The relative number of *atzD* mRNA in burrow-linings at 13 days was undetermined as quantification was obtained for one replicate only (Fig. 3A). In the Vezin soil, *atzD* mRNA copy number in soil microsites showed similar pattern at 7 and 13 days: *atzD* expression was the highest in burrow-linings and the lowest in bulk soil, with casts as intermediate (Fig. 3B). Regarding the two incubation times, only the *atzD* expression in burrow-linings significantly differed from the one in bulk soil ($F=9.86$, $P<0.01$, data not shown). In both soils and all microsites, the *atzD* mRNA copy number decreased from 7 to 13 days.

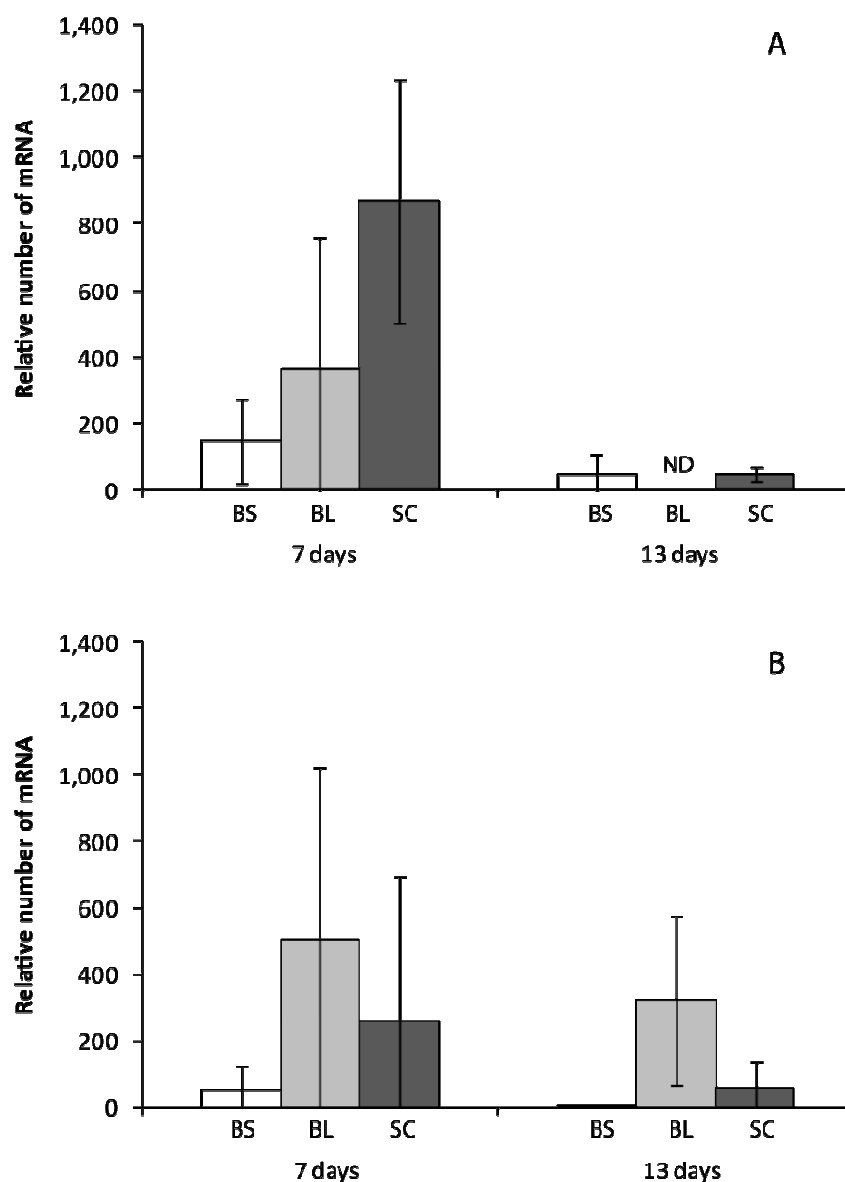


Fig. 3: Relative number of *atzD* mRNA per 10^6 16S rRNA measured in bulk soil (BS, white bars), burrow-linings (BL, pale grey) and in surface casts (SC, dark grey) from Epoisses (A) and Vezin (B) soil microcosms after 7 and 13 days of incubation. ND: Not determined.

Discussion

The use of RT-qPCR to quantify functional gene expression allowed detection of low abundance of mRNA (Saleh-Lakha *et al.*, 2005). Due to sample and processing variation, this technique requires the use of an internal reference to estimate gene expression as a relative amount of target mRNA and to normalized quantification. Quantification of specific mRNA is ideally made relative to a constitutively expressed household gene as often applied in studies on eukaryotic gene expression (e.g. Yuan *et al.*, 2000; Semighini *et al.*, 2002). As no such bacterial gene has yet been identified, mRNA levels have already been related to the

simultaneous extracted DNA *i.e.* mRNA/DNA ratios (Leininger *et al.*, 2006). However, in our experiments the 16S rRNA is synthesized at a relatively stable level and could be used as an internal reference in gene expression studies. As Devers *et al.* (2004), we chose to relate the levels of *atzD* mRNA obtained to the amount of 16S rRNA simultaneously present (*i.e.* mRNA/16S rRNA). This ratio corresponded to the proportion of active atrazine degraders (harboring *atzD*) in relation to the total active bacteria in the different soil microsites.

As previously observed, the bulk soil from Epoisses was able to rapidly mineralized atrazine compared to the one from Vezin (Rousseaux *et al.*, 2001; Kersante *et al.*, 2006; Monard *et al.*, 2008). At the same time, the relative number of *atzD* mRNA was always higher in bulk soil from Epoisses (Fig. 2). The atrazine amendment applied two weeks before the beginning of the experiment might have allowed rapid and high mineralization activity in the soil from Epoisses similarly to the recent work performed with repeated amendments of MCPA (Nicolaisen *et al.*, 2008). Thus, the mineralization curves in Epoisses soil microsites showed two segments: a steep slope segment and a plateau. It has been found that starved cells were able to maintain an elevated background pool of mRNA, providing an adaptation for rapid onset of degradation as soon as substrate again became available (Thorne & Williams, 1997; Bollmann *et al.*, 2005). However, this adaptation occurs only if the genetic pool is initially present since this rapid atrazine mineralization was not observed in the soil from Vezin.

Interestingly, no *atzA* expression was detected in both soils while it has been found to be basal without atrazine and enhanced in presence of atrazine *in vitro* for two bacterial strains (Martinez *et al.*, 2001; Devers *et al.*, 2004). Different explanations can be invoked. First, the level of expression might have been below the detection limit of our RT-qPCR analysis since *atzA* expression was detected after bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. Secondly, the number of indigenous bacteria expressing this gene might have not been numerous enough to detect *atzA* mRNA. Moreover, *in situ* *atzA* expression might be different than the one observed in pure culture.

As the dechlorination step was not supported by the *trzN* gene since it was not detected, other degradation pathways leading to formation of cyanuric acid, further degraded by the enzyme encoded by the *atzD* gene, might have been involved. Atrazine degradation to dealkylated metabolites (DEA and DIA) (Giardina *et al.*, 1982) might occurs in both soils. Whereas this non-specific pathway of degradation leads to slow atrazine mineralization (Seffernick & Wackett, 2001; Shapir *et al.*, 2007), its association with the ring cleavage through expression of *atzD* might have enhanced the mineralization kinetics as observed in the Epoisses soil.

Abdelhafid et al. (2000) observed that both hydroxyatrazine and dealkylated metabolites were detected in an 'adapted' and a 'non-adapted' soils and supposed that microorganisms responsible for atrazine ring mineralization were active only in the adapted soils. Our results showed that in non adapted soil the *atzD* gene, leading to atrazine ring cleavage and thus to ring mineralization, was expressed. The lower atrazine mineralization kinetic detected in 'non-adapted' soil may be explain by a smaller level of expression of *atzD* gene probably associated with a lower atrazine availability as proposed by Barriuso & Houot (1996). In fact, it has been shown that atrazine availability decreases with residence time in soil which resulted in significant reduced biodegradation (Binet et al., 2006).

The *atzD* mRNA relative number per 10^6 16S rRNA varied from 4 to 868 corresponding to values obtained with transcript quantification in pure cultures (Devers *et al.*, 2004). In both bulk soils, the *atzD* gene expression was enhanced 7 days after atrazine addition. In contrast to *atzA*, *atzD* expression is activated by AtzR, a LysR-like regulator, in the presence of cyanuric acid in *Pseudomonas* sp. ADP (Garcia-Gonzalez et al., 2005). The trans regulation of *atzD* expression with cyanuric acid implied differences in expression level with incubation time, as observed in our experiments. According to the mRNA half life, that has been estimated to be of the order of minutes (Selinger et al., 2003), our results showed that in microsites from the Epoisses soil, *atzD* was still expressed at high level at the beginning of the plateau of degradation (at 7 days). This suggests that the adequate pool of degradation enzyme was not reached. When the plateau was attained, levels of expression decreased indicating that cyanuric acid concentration was too low to induce *atzD* transcription (Fig. 1 and 3).

The atrazine mineralization kinetics and the relative number of *atzD* mRNA in the different soil microsites differed between the two soils. Thus, in the Epoisses soil, atrazine mineralization and the level of *atzD* gene expression in casts were higher than in bulk soil whereas in the Vezin soil the highest *atzD* expression was observed in burrow-linings. Though, atrazine mineralization was increased in the microsites generated by earthworm bioturbation confirming their 'hot spot' status towards microbial activities. However, the soil bioturbation differently impacted atrazine mineralization depending on the physical and chemical properties and the bacterial diversity and activity in the initial soil.

In previous studies, no correlation between the amounts of *atzA* gene and atrazine mineralization in the soil drilosphere was observed (Kersante *et al.*, 2006; Monard *et al.*, 2008). It was concluded that the quantification of *atzA* gene could not provide a direct estimation of the effectiveness of atrazine mineralization. According to the present results,

this lack of correlation between the amount of *atzA* gene and atrazine mineralization is explained as *atzA* might be present in soil but not expressed.

In the present study, quantification of mRNA allowed us to focus on active bacteria contrarily to DNA. Higher relative number of *atzD* mRNA in casts from the Epoisses soil and in burrow-linings from the Vezin soil at 7 days was consistent with the higher amount of mineralized atrazine. However, this correlation between the *atzD* mRNA relative quantity and the atrazine mineralization should be noised by possible post-transcriptional regulation as suggested by our results.

Because we performed transcriptional analysis by comparing two soils with different atrazine degrading abilities, the study underlined the importance of the soil heterogeneity in the atrazine degradation activity. As far as we know, the present study is the first that reported atrazine degradation gene expression in soil and the extent to which this expression can be impacted by soil bioturbation.

References

- Abdelhafid R, Houot S, Barriuso E (2000) Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 389-401.
- Alvey S, Crowley DE (1996) Survival and Activity of an Atrazine-Mineralizing Bacterial Consortium in Rhizosphere Soil. *Environmental Science and Technology* **30**, 1596-1603.
- Barriuso E, Houot S (1996) Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 1341-1348.
- Behki R, Topp E, Dick W, Germon P (1993) Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1955-1959.
- Binet F, Kersante A, Munier-Lamy C, *et al.* (2006) Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 1255-1263.
- Binet F, Trehen P (1992) Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* **24**, 1501-1506.
- Bollmann A, Schmidt I, Saunders AM, Nicolaisen MH (2005) Influence of Starvation on Potential Ammonia-Oxidizing Activity and amoA mRNA Levels of *Nitrosospira briensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1276-1282.
- Cerniglia CE (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351-368.
- Daily GC, Alexander S, Ehrlich PR, *et al.* (1997) Ecosystem services: benefits supplied to human society by natural ecosystems. In: *Issues in Ecology*. Ecological Society of America.
- de Souza ML, Sadowsky MJ, Wackett LP (1996) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *Journal of Bacteriology* **178**, 4894-4900.
- de Souza ML, Wackett LP, Sadowsky MJ (1998) The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 2323-2326.

- Devers M, Soulas G, Martin-Laurent F (2004) Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 3-15.
- Eaton RW, Karns JS (1991) Cloning and comparison of the DNA encoding ammelide aminohydrolase and cyanuric acid amidohydrolase from three s-triazine-degrading bacterial strains. *Journal of Bacteriology* **173**, 1363-1366.
- El Sebai T, Lagacherie B, Soulas G, Martin-Laurent F (2007) Spatial variability of isoproturon mineralizing activity within an agricultural field: Geostatistical analysis of simple physicochemical and microbiological soil parameters. *Environmental Pollution* **145**, 680-690.
- Ettema CH, Wardle DA (2002) Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 177-183.
- Garcia-Gonzalez V, Govantes F, Porrua O, Santero E (2005) Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *Journal of Bacteriology* **187**, 155-167.
- Giardina MC, Giardi MT, Filacchioni G (1982) Atrazine metabolism by *Nocardia*: elucidation of initial pathway and synthesis of potential metabolites. *Agricultural and Biological Chemistry* **46**, 1439-1445.
- Kersante A, Martin-Laurent F, Soulas G, Binet F (2006) Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* **57**, 192-205.
- Leininger S, Urich T, Schlöter M, *et al.* (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**, 806-809.
- Mandelbaum RT, Allan DL, Wackett LP (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1451-1457.
- Martin-Laurent F, Benoît B, Isabelle W, *et al.* (2006) Impact of the Maize Rhizosphere on the Genetic Structure, the Diversity and the Atrazine-degrading Gene Composition of Cultivable Atrazine-degrading Communities. *Plant and Soil* **V282**, 99-115.
- Martinez B, Tomkins J, Wackett LP, Wing R, Sadowsky MJ (2001) Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology* **183**, 5684-5697.

- Meysman FJR, Middelburg JJ, Heip CHR (2006) Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology and Evolution* **21**, 688-695.
- Monard C, Lima O, Martin-Laurent F, Binet F, Vandenkoornhuysen P (submitted) Optimization of RNA extraction from small soil samples to quantify gene expression.
- Monard C, Martin-Laurent F, Vecchiato C, *et al.* (2008) Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **In press**.
- Mulbry WW, Zhu H, Nour SM, Topp E (2002) The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters* **206**, 75-79.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, *et al.* (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**, 655-670.
- Nicolaisen MH, Baelum J, Jacobsen CS, Sorensen J (2008) Transcription dynamics of the functional *tfdA* gene during MCPA herbicide degradation by *Cupriavidus necator* AEO106 (pRO101) in agricultural soil. *Environmental Microbiology* **10**, 571-579.
- Piutti S, Hallet S, Rousseaux S, *et al.* (2002) Accelerated mineralisation of atrazine in maize rhizosphere soil. *Biology and Fertility of Soils* **36**, 434-441.
- Prosser JI (2002) Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil* **244**, 9-17.
- Radosevich M, Traina SJ, Hao YL, Tuovinen OH (1995) Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 297-302.
- Rousseaux S, Hartmann A, Soulas G (2001) Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology* **36**, 211-222.
- Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, *et al.* (2005) Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods* **63**, 1-19.
- Seffernick JL, Wackett LP (2001) Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry* **40**, 12747-12753.

- Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, Church GM, Rosenow C (2003) Global RNA Half-Life Analysis in *Escherichia coli* Reveals Positional Patterns of Transcript Degradation. *Genome Res.* **13**, 216-223.
- Semighini CP, Marins M, Goldman MHS, Goldman GH (2002) Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1351-1357.
- Shapir N, Mongodin EF, Sadowsky MJ, *et al.* (2007) Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *Journal of Bacteriology* **189**, 674-682.
- Smith D, Alvey S, Crowley DE (2005) Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology* **53**, 265-275.
- Soulas G (1993) Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **25**, 443-449.
- Stenrod M, Charnay M-P, Benoit P, Eklo OM (2006) Spatial variability of glyphosate mineralization and soil microbial characteristics in two Norwegian sandy loam soils as affected by surface topographical features. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 962-971.
- Swift MJ, Izac AMN, van Noordwijk M (2004) Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes - are we asking the right questions? *Agriculture, Ecosystems & Environment* **104**, 113-134.
- Thorne SH, Williams HD (1997) Adaptation to nutrient starvation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*: analysis of survival, stress resistance, and changes in macromolecular synthesis during entry to and exit from stationary phase. *J. Bacteriol.* **179**, 6894-6901.
- Topp E, Zhu H, Nour SM, *et al.* (2000) Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2773-2782.
- Walker A, Bromilow RH, Nicholls PH, Evans AA, Smith VJR (2002) Spatial variability in the degradation rates of isoproturon and chlorotoluron in a clay soil. *Weed Research* **42**, 39-44.

- Xia T, Baumgartner JC, David LL (2000) Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiology and Immunology* **15**, 273-275.
- Yanze-Kontchou C, Gschwind N (1994) Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4297-4302.
- Yuan A, Yu C-J, Luh K-T, *et al.* (2000) Quantification of VEGF mRNA expression in non-small cell lung cancer using a real-time quantitative reverse transcription-PCR assay and a comparison with quantitative competitive reverse transcription-PCR. *Laboratory Investigation* **80**, 1671-1680.

4. Bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne associée à la bioaugmentation

La bioaugmentation consistant à inoculer des bactéries dégradantes constitue une solution potentielle pour la dépollution de sols pollués. Afin d'estimer le devenir de ces bactéries exogènes dans le sol et leur impact *in situ*, nous nous sommes intéressés à l'impact de la bioaugmentation sur la structure des communautés indigènes du sol et sur la minéralisation de l'atrazine en interaction avec la bioturbation du sol par les lombriciens. Nous avons également étudié son effet sur l'expression des gènes de dégradation de l'atrazine (*atzA* et *atzD*) et donc sur l'activité des bactéries dégradantes dans différents microsites de sol générés par la bioturbation. Ces expérimentations ont été réalisées avec inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP ou *C. heintzii* (1.6×10^7 CFU par gramme de sol sec).

4.1. Structure des communautés bactériennes dans les différents microsites de sol générés par la bioturbation après ou non bioaugmentation : analyses RISA

En parallèle des quantifications de gènes et des minéralisations de l'atrazine réalisées (l'article 2 'Combined effects of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil') des analyses des communautés bactériennes présentes dans les différents microsites issus de la bioturbation du sol de Vezin par les lombriciens avec ou non inoculation d'une souche dégradante (*Pseudomonas* sp. ADP ou *C. heintzii*) ont été réalisées par RISA (pour plus de détails cf chapitre I partie 5.1 et chapitre II partie 5.2). A partir des ADNs extraits dans les différents échantillons, des PCRs ciblant les espaces intergéniques (IGS) bactériens (16S-23S) ont été réalisées et le polymorphisme des produits d'amplification obtenus a été analysé après séparation par migration dans un gel d'acrylamide. Les RISAs nous ont permis de mettre en évidence des profils complexes (figure III-1). Toutefois, les 5 réplicats expérimentaux réalisés présentent des profils similaires dans la plupart des cas.

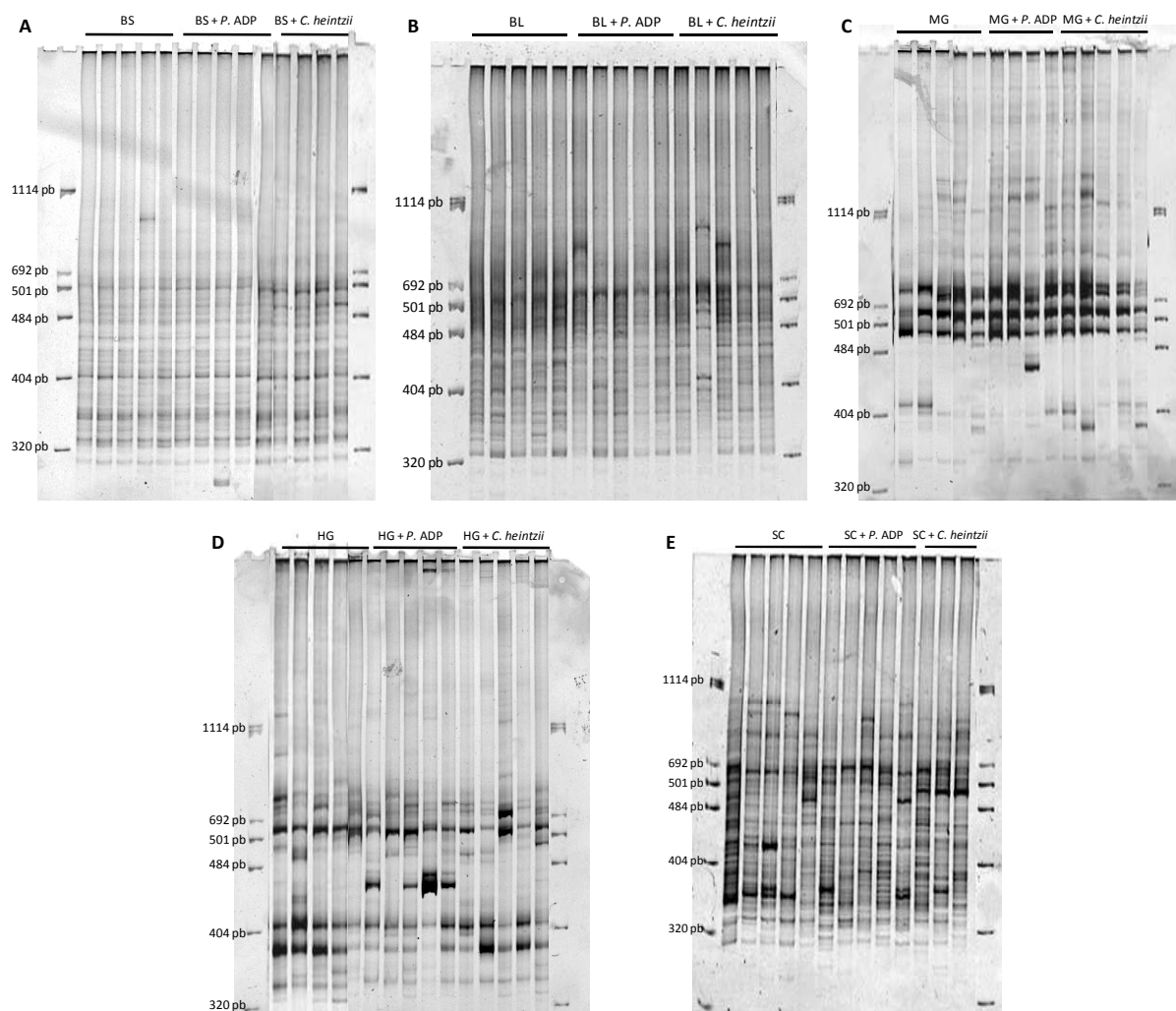


Figure III-1 : Gels acrylamides (6 %) des RISA 16S-23S (PCR IGS) traduisant la diversité bactérienne dans les microsites de sol (A. Bulk soil (BS)-sol environnant, B. Burrow-linings (BL)-paroi de galerie, C. midgut (MG)-endentère médian, D. hindgut (HG)-endentère postérieur et E. Surface casts (SC)-turricules).

L'analyse en composante principale (ACP) basée sur l'intensité et le nombre de bandes observées nous a permis de différencier les communautés bactériennes associées au traitement de bioaugmentation (figure III-2A) et aux différents microsites générés par la bioturbation du sol par la macrofaune (figure III-2B). Ces ACPs montrent que la bioaugmentation ne modifie pas la structure des communautés bactériennes du sol contrairement à la bioturbation.

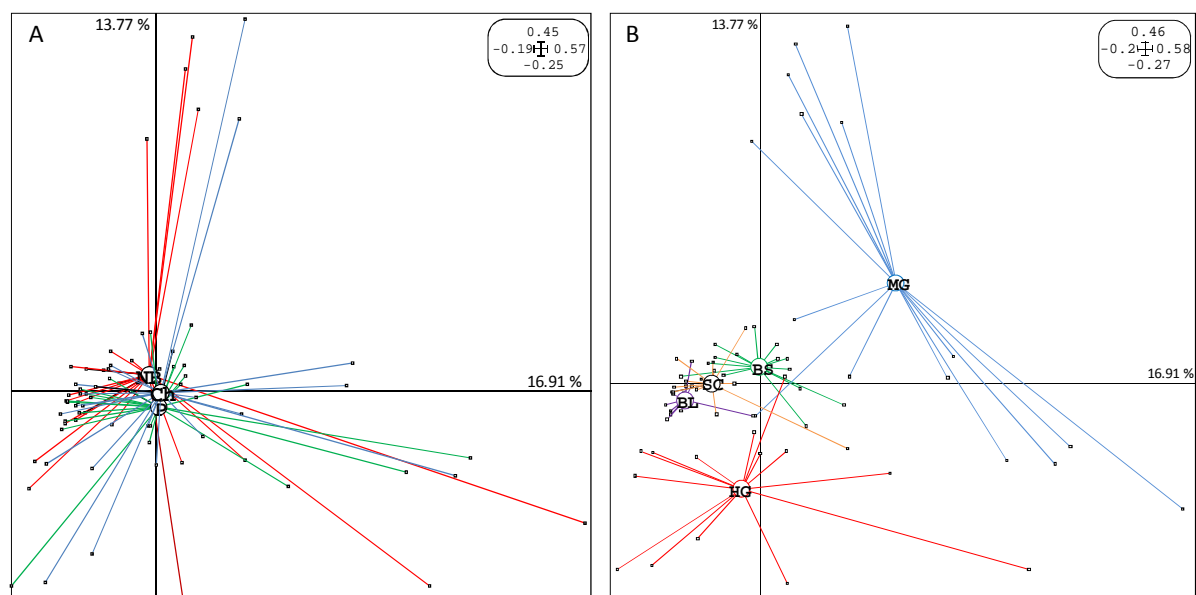


Figure III-2 : Analyse en composantes principales (ACP) des RISA 16S-23S sur l'ensemble des microsites de sols bioaugmentés ou non. A. Représentation en fonction du traitement (non bioaugmenté (NB), bioaugmenté avec *Pseudomonas* sp. ADP (P) et avec *C. heintzii* (Ch)) et B. Représentation en fonction des microsites de sol (Bulk soil (BS)-sol environnant, Burrow-linings (BL)-paroi de galerie, midgut (MG)-endentère médian, hindgut (HG)-endentère postérieur et Surface casts (SC)-turricules)

4.2. Minéralisation de l'atrazine après bioaugmentation

Les cinétiques de minéralisation de l'atrazine dans le sol non bioturbés, les parois de galeries et les turricules issus des sols d'Epoisses et de Vezin après bioaugmentation de *Pseudomonas* sp. ADP (1.6×10^7 CFU par gramme de sol sec) sont présentées dans la figure III-3.

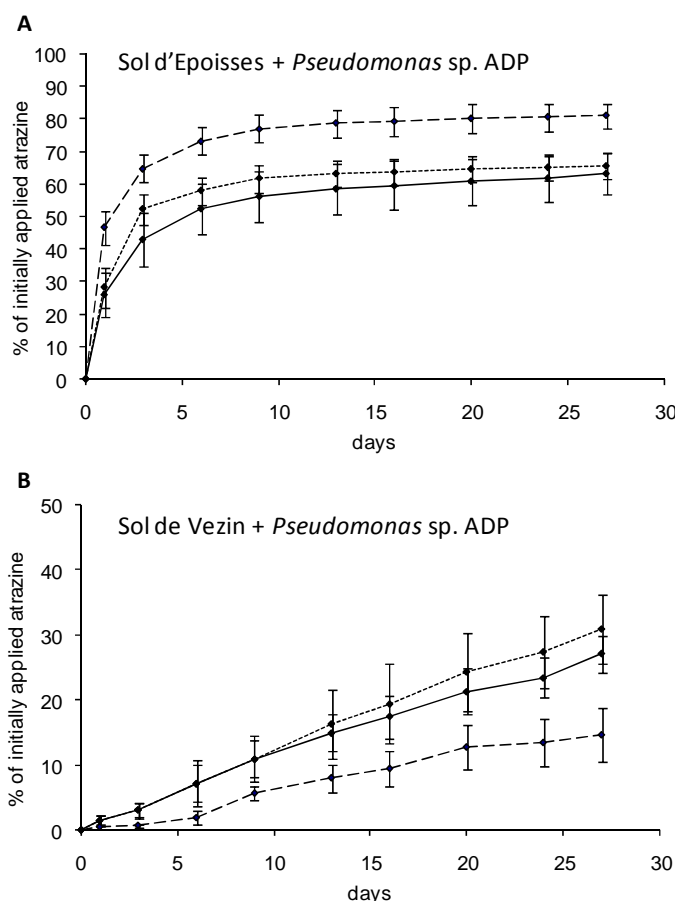


Figure III-3: cinétiques de minéralisation de l'atrazine pendant les 27 jours suivants l'apport de ^{14}C -cycle atrazine (exprimé en % d'atrazine initialement appliquée) dans le sol environnant (trait plein), les parois de galeries (trait pointillé) et les turricules (tirets) issus des microcosmes des sols d'Epoisses (A) et de Vezin (B) inoculés par *Pseudomonas* sp. ADP (1.6×10^7 CFU par gramme de sol sec). Pour comparaison avec cinétiques de minéralisation mesurées sans inoculation cf figure 1 article 'Analysis of *atz* gene expressions during atrazine degradation in soil drilosphere' (article 3).

Etonnamment, dans tous les cas les quantités d'atrazine minéralisée sont plus faibles avec inoculation de la souche dégradante que sans (cf figure 1 article 3 'Analysis of *atz* gene expressions during atrazine degradation in soil drilosphere'). Les taux de minéralisation initiale (de 0 à 3 jours) sont également soit plus faibles soit identiques à ceux observés sans inoculation. Néanmoins, dans les deux traitements, la minéralisation est la plus importante dans le sol d'Epoisses. Ainsi, après 27 jours, de 63 à 81 % de l'atrazine initialement apportée est minéralisée dans les microsites du sol d'Epoisses alors que dans ceux du sol de Vezin seulement 15 à 31 % de l'atrazine a été minéralisée. Comme sans inoculation, dans le sol d'Epoisses la minéralisation de l'atrazine est la plus importante et la plus rapide dans les turricules alors que dans le sol de Vezin les cinétiques et taux de

minéralisation les plus élevés sont observés dans les parois de galeries et les plus faibles dans les turricules.

4.3. Quantification de l'expression des gènes *atzA* et *atzD* dans les microsites après inoculation du sol par *Pseudomonas* sp. ADP

L'expression de l'ARNr 16S et des gènes *atzA* et *atzD* a également été quantifiée après inoculation du sol avec la souche *Pseudomonas* sp. ADP (1.6×10^7 CFU par g de sol sec) dans les microcosmes de sol. L'expression de ces gènes a donc été quantifiée dans le sol non bioturbé, les parois de galeries et les turricules issus des sols d'Epoisses et de Vezin et la minéralisation de l'atrazine a été suivie en parallèle.

4.3.1. Expression des gènes *atzA* et *atzD* dans le sol bioaugmenté non bioturbé

Comme précisé dans l'article 'Analysis of *atz* gene expressions during atrazine degradation in soil drilosphere' (article 3), l'expression d'*atzA* a été détectée en présence de *Pseudomonas* sp. ADP mais, dans tous les cas, elle est plus faible que celle d'*atzD* (figure III-4), notamment à 7 et 13 jours après l'apport d'atrazine. Ces quantités de gènes exprimés sont présentées sous forme de nombre relatif d'ARNm par million d'ARNr 16S correspondant à la proportion de bactéries dégradantes (possédant le gène *atzD*) par rapport au nombre de bactéries actives totales dans le sol.

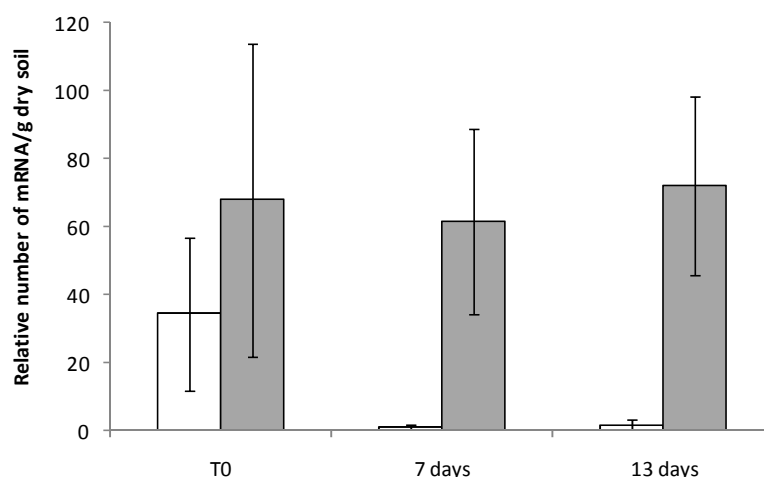


Figure III-4 : Nombre relatif d'ARNm *atzA* (blanc) et *atzD* (gris) par 10^6 ARNr16S dans le sol non bioturbé d'Epoisses inoculé par *Pseudomonas* sp. ADP (1.6×10^7 CFU par g de sol sec).

Dans le sol non bioturbé d'Epoisses et de Vezin, l'expression d'*atzA* est toujours significativement inférieure après 7 et 13 jours d'inoculation que initialement au T₀ (Tableau III-1). Aucune expression du gène *atzA* n'a été observée dans les turricules, quel que soit le sol. Dans le sol non bioturbé, l'expression relative du gène *atzA* est plus importante dans le sol de Vezin que dans celui d'Epoisses alors que pour *atzD* il n'y a pas de différence à cause des écarts types importants. L'expression relative du gène *atzA* varie significativement entre microsites ($F=4.63$, $P<0.05$) mais pas entre les deux sols ($F=0.4$, $P=0.533$).

4.3.2. Expression du gène *atzD* dans les microsites de sol bioaugmentés

Alors que sans inoculation *atzD* était significativement différemment exprimé entre les microsites de sol, cela n'est plus observé en présence de *Pseudomonas* sp. ADP ($F=1.01$, $P=0.377$). Néanmoins, aucun effet significatif de l'inoculation sur l'expression d'*atzD* n'a été observée ($F=1.71$, $P=0.194$).

Parmi les microsites issus du sol d'Epoisses des différences d'expression du gène *atzD* étaient observée en l'absence d'inoculation ce qui n'est plus le cas avec *Pseudomonas* sp. ADP (Tableau III-1). Dans le sol non bioturbé de Vezin, l'expression d'*atzD* est significativement plus importante après inoculation mais cela n'est pas le cas dans les parois de galeries et les turricules (Tableau III-1).

Tableau III-1: Nombre relatif d'ARNm *atzD* par 10^6 ARNr 16S dans les différents microsites des sols d'Epoisses et de Vezin avec ou non inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP (1.6×10^7 CFU par g de sol sec) au différents temps d'incubation.

Sol	Traitement	Microsites	Temps (jours)	Moyenne (<i>atzD</i> / 10^6 16S rRNA)	Ecart-type	Moyenne (<i>atzA</i> / 10^6 16S rRNA)	Ecart-type
Epoisses	Non-inoculé	Sol contrôle (BS)	0	30.6	22.7	34.3	22.5
			7	146.3	126.5		
			13	45.9	65.5		
		Paroi de galerie (BL)	7	362.7	394.6		
			13	510.2	-		
		Turricules (SC)	7	867.9	367.1		
			13	46.1	20.9		
	+ <i>P.</i> ADP	Sol contrôle (BS)	0	68.0	46.1	1.0	0.6
			7	61.5	27.3		
			13	72.0	26.1		
		Paroi de galerie (BL)	7	9.1	6.9		
			13	70.4	60.1		
		Turricules (SC)	7	75.3	30.6		
Vezin	Non-inoculé	Sol contrôle (BS)	0	3.6	2.0	293.1	56.7
			7	49.2	73.9		
			13	3.5	3.1		
		Paroi de galerie (BL)	7	504.0	521.0		
			13	322.3	256.9		
		Turricules (SC)	7	256.9	438.6		
			13	58.1	77.7		
	+ <i>P.</i> ADP	Sol contrôle (BS)	0	1106.8	1083.0	48.2	72.9
			7	25.4	22.7		
			13	107.0	151.0		
		Paroi de galerie (BL)	7	284.6	260.7		
			13	90.4	88.4		
		Turricules (SC)	7	23.8	15.5		
			13	69.6	88.5		

4.4. Discussion

Comme observé par Cunliffe et al. (2006) dans le cadre de la dégradation de HAPs, l'inoculation d'une souche dégradante n'affecte pas la structure des communautés bactériennes indigènes du sol (figure III-2A). La bioaugmentation ne modifie pas non plus l'abondance des bactéries indigènes comme observé dans l'article 'Combined effects of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil' (figure 1). De plus, en association avec la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne, l'impact de la bioaugmentation sur la structure des communautés bactériennes indigènes du sol est masqué par celui généré de la bioturbation (figure III-2).

Bien que la réaction de déchloration réalisée par le gène *atzA* soit une étape clé dans la dégradation de l'atrazine, dans nos conditions expérimentales elle ne semble pas limiter la minéralisation du pesticide. En effet, les cinétiques de minéralisation de l'atrazine sont moins importantes en présence de *Pseudomonas* sp. ADP, alors que le gène *atzA* est exprimé, que sans inoculation et donc sans expression d'*atzA*. De plus, après l'apport d'atrazine les quantités d'ARNm *atzA* diminuent significativement par rapport aux quantités initiales. Ces résultats contredisent de précédentes observations qui avaient montré un effet

synergique des lombriciens et de l'inoculation de souches dégradantes sur la dégradation de PCB dans le sol (Luepromchai et al., 2002) ou encore une stimulation de la dégradation de l'atrazine après inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP à une concentration de 1.1×10^8 CFU par g de sol sec (Newcombe and Crowley, 1999). Dans notre cas, il est possible que *Pseudomonas* sp. ADP soit entré en compétition avec la population bactérienne indigène. En effet, comme l'on montré Cunliffe et al. (2006), pour survivre les souches inoculées doivent envahir les communautés microbiennes indigènes du sol dont la diversité peut agir comme barrière de résistance limitant le maintien de la souche inoculée.

En présence de la souche *Pseudomonas* sp. ADP le gène *atzA* est exprimé plus faiblement que le gène *atzD*. Cela se justifie par le fait que l'expression d'*atzA* ne dépend que de la souche inoculée alors que les quantités de gène *atzD* exprimées correspondent à la fois à *Pseudomonas* sp. ADP et aux bactéries indigènes du sol. De plus, une protéine de régulation (AtzR) de l'expression d'*atzD* en présence d'acide cyanurique a été identifiée dans la souche *Pseudomonas* sp. ADP (Garcia-Gonzalez et al., 2005) alors que même si l'expression d'*atzA* est stimulée en présence de forte concentrations d'atrazine (55 mg.L^{-1}) chez cette même souche, aucun système de régulation n'a encore été détecté (Devers et al., 2004).

Comme l'avaient montré Kersanté et al. (2006), un effet négatif de la digestion du sol par le ver est de nouveau observé dans le sol de Vezin puisque dans les turricules, la minéralisation de l'atrazine est moins importante que dans les autres microsites ce qui est corrélé à une expression d'*atzD* plus faible. De plus, la digestion et l'excrétion du sol par les vers de terre a un effet négatif sur l'expression des gènes *atzA* car ce gène n'est pas exprimé dans les turricules issus des deux sols. Alors que le passage dans le tube digestif des vers stimule la germination d'endospores (Fischer et al., 1997; Drake and Horn, 2007) qui ne sont formés que par les bactéries Gram +, il semblerait que la digestion ait un effet négatif sur l'activité des bactéries Gram - telle que *Pseudomonas* sp. ADP. Néanmoins, dans le sol d'Epoisses une stimulation de la minéralisation de l'atrazine est observée dans les turricules, celle-ci n'est donc pas associée à l'expression du gène *atzA* mais à celle d'*atzD*.

Dans des objectifs de dépollution de sols pollués, l'hétérogénéité du sol associée à la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne est à prendre en compte. Alors que le lombricien peut faciliter la dissémination des bactéries inoculées dans le sol (Luepromchai et al., 2002), à l'échelle des microsite qu'il génère et précisément des turricules la survie de ces bactéries n'est pas avérée (Heijnen and Marinissen, 1995). Afin de limiter cet impact négatif

de la digestion du sol par les lombriciens sur les bactéries dégradant l'atrazine inoculées, une solution serait de protéger préalablement les bactéries utilisées pour la bioaugmentation dans des particules d'argile comme proposé par Grundmann et al. (2007).

Ces résultats obtenus en présence de la souche *Pseudomonas* sp. ADP additionnés à ceux observés sans inoculation montrent que l'expression de gènes fonctionnels et leur diversité exprimée ne sont pas directement corrélées au processus encodé et que l'inoculation de souches dégradantes n'augmente pas forcément la minéralisation de l'atrazine dans le sol.

5. Synthèse du chapitre III

Comme précédemment observé, les quantifications de l'ARNr 16S et du gène le codant ainsi que l'analyse de communautés bactériennes dans les différents microsites générés par la bioturbation du sol par les lombriciens montre que les vers de terre modifient significativement les communautés bactériennes indigènes du sol (Schonholzer et al., 2002; Tiunov and Dobrovolskaya, 2002; Kersante et al., 2006). Alors que dans les différents microsites de sols générés par la bioturbation, les bactéries totales sont moins abondantes, aucune différence significative d'activité (ARNr 16S) n'a été observée. Ainsi, si le nombre de bactéries présentes diminue mais que l'activité totale ne varie pas, l'activité individuelle des bactéries présentes doit être stimulée. En plus de cet impact sur l'abondance et l'activité des bactéries indigènes du sol, les lombriciens modifient la structure et donc la composition de ces communautés, et particulièrement dans le sol ingéré confirmant les résultats obtenus par Kersante et al. (2006). Ces communautés bactériennes présentes dans les endentères peuvent correspondre à i) des communautés bactériennes spécifiques au système digestif des lombriciens comme observé par Singleton et al. (2003), ii) des bactéries peu représentées dans le sol non bioturbé et stimulées par les conditions spécifiques aux endentères (humidité, anoxie, pH, présence d'enzymes digestives, de sucres...) (Fischer et al., 1997; Drake and Horn, 2007) et/ou iii) une nutrition sélective des vers de terre qui ingèrent préférentiellement du sol contenant de grandes concentrations en bactéries (Pedersen and Hendriksen, 1993). Néanmoins, il semblerait que chacune des parties du tube digestif du ver possède sa propre communauté bactérienne symbiotique et que l'abondance de celles-ci diffère entre les parties médianes et postérieures des endentères. Les bactéries ingérées avec le sol seraient alors faiblement représentées. Ainsi, après excrétion du sol, les communautés bactériennes présentes dans les turricules ne diffèrent que légèrement de celles du sol environnant. Lavelle et al. (2005) ont observé lors du vieillissement de ces microsites une évolution de la structure des communautés bactériennes vers celle du sol initial non bioturbé. Ainsi le passage dans le tube digestif du ver aurait surtout modifié le nombre et l'activité métabolique des bactéries du sol plutôt que leur structure.

Pour étudier l'effet de la bioturbation du sol sur les communautés bactériennes dégradant l'atrazine, deux sols avec des capacités de minéralisation de ce pesticide différentes ont été utilisés. Ainsi le sol de Vezin est faiblement capable de minéraliser l'atrazine (Kersante et al., 2006) et l'expression du gène *atzD* y est plus faible que dans le sol

d'Epoisses à forte capacité de minéralisation (Rousseaux et al., 2001). Le sol de Vezin utilisé pour les expérimentations de quantification de gènes et d'ARN transcrit (articles 2 et 3) a été prélevé sur la même parcelle mais à deux années d'intervalle et malgré les variations annuelles probables à l'échelle bactérienne (Griffiths et al., 2001) la capacité de minéralisation de l'atrazine de ce sol reste inchangée.

Alors que dans la première expérimentation nous nous sommes concentrés sur le gène *atzA*, nous montrons que l'expression de ce gène n'est pas détectée sans inoculation (article 3). Ce gène bien qu'étant présent dans les deux sols, n'est soit pas exprimé du tout, soit exprimé à un niveau trop faible pour être détecté par RT-qPCR. Cette absence d'expression justifie qu'aucune corrélation entre le nombre d'*atzA* et les cinétiques de minéralisation n'ai été retrouvée dans les microsites issus de la bioturbation dans l'article 'Combined effects of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil' (article 2). Contrairement à notre hypothèse de départ, le gène *atzA* ne représente donc pas un bon candidat pour l'étude de l'expression des gènes de dégradation de l'atrazine *in situ*. D'autres gènes de dégradation de l'atrazine non recherchés dans ces expérimentations doivent constituer de meilleurs indicateurs de cette activité dégradante.

En modifiant les communautés bactériennes indigènes du sol, la bioturbation agit également sur les bactéries dégradant l'atrazine initialement présentes dans le sol. Cette interaction semble dépendante du sol dans lequel le ver évolue. Dans le sol de Vezin, les bactéries indigènes dégradant l'atrazine sont sélectionnées dans les parois de galerie en relation avec un changement dans la structure des communautés bactériennes par rapport au sol non bioturbé, l'expression du gène *atzD* y est plus élevée et la minéralisation de l'atrazine y a été observée plus importante que dans les autres microsites. A l'opposé, dans le sol d'Epoisses la minéralisation de l'atrazine et l'expression d'*atzD* sont stimulés dans les turricules. Ainsi, dans les deux sols étudiés, les lombriciens génèrent des microhabitats favorables à l'activité de biodégradation de l'atrazine ('hot-spots') en fonction des caractéristiques initiales des sols.

L'inoculation de *Pseudomonas* sp. ADP ou de *C. heintzii* stimule significativement la minéralisation de l'atrazine dans le sol de Vezin non bioturbé mais cela n'a pas été vérifié une seconde fois après bioaugmentation par la souche *Pseudomonas* sp. ADP. Ces résultats montrent l'importance de l'hétérogénéité du sol dans la réalisation des fonctions qu'il supporte et peuvent expliquer pourquoi l'impact de la bioturbation du sol par les lombriciens sur la dégradation de l'atrazine est controversé (Meharg, 1996; Farenhorst et al., 2000b;

Gevao et al., 2001; Binet et al., 2006; Kersante et al., 2006). Cette stimulation de la minéralisation de l'atrazine après bioaugmentation n'a pas non plus été observée pour le sol d'Epoisses. L'inoculation de souches dégradantes n'a donc pas toujours un effet positif sur la dégradation de l'atrazine et là encore, les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol doivent intervenir. Ainsi, un rapport de compétition entre les souches inoculées et les bactéries indigènes du sol peut être observé selon l'abondance des bactéries indigènes du sol (occupation de la niche écologique) et les ressources disponibles (Cunliffe and Kertesz, 2006).

L'effet négatif de la digestion du sol par les lombriciens sur les bactéries inoculées est doublement observé : soit la minéralisation de l'atrazine est significativement réduite, soit le gène *atzA* n'est plus exprimé dans les turricules. Les deux bactéries utilisées étant des bactéries Gram -, elles doivent être plus sensibles au passage dans le tube digestif du ver que les bactéries Gram + qui ont été montrées stimulées par la digestion des lombriciens (Fischer et al., 1997).

Ce chapitre III montre la difficulté des études fonctionnelles au sein d'une matrice complexe telle que le sol qui plus est dans un contexte de bioturbation par les lombriciens. Associés à la grande hétérogénéité de ce système, différents paramètres sont à prendre en compte, que ce soient les propriétés intrinsèques du sol, le gène cible à recherché ou encore les souches bactériennes à utiliser. Dans des perspectives de valorisation et de transferts vers des écotechniques, une étude préalable de ces différents éléments semble indispensable.

CHAPITRE IV

**Rôle de la bioturbation sur la diversité des communautés
bactériennes du sol actives et sur celles dégradants un
substrat carboné simple ou complexe (atrazine)**

1. Introduction

Cette deuxième partie expérimentale présente les résultats obtenus au cours de l'étude de l'impact de la bioturbation sur la structure et la diversité des communautés bactériennes actives dans le sol. Elle regroupe l'ensemble des données obtenues avec l'utilisation du SIP à partir d'ARN.

Le premier article (article 4) intitulé 'Short-term response of soil bacteria to carbon enrichment in different soil microsites' correspond à une validation de la mise au point et de l'optimisation de la technique de SIP basé sur l'ARN. Simultanément, cette validation visait des objectifs scientifiques concernant l'impact de la bioturbation sur la réponse des bactéries du sol à un enrichissement en carbone. Deux hypothèses ont ainsi été posées, (i) différentes sources de carbone initient différentes réponses des communautés bactériennes actives dans le sol et (ii) cette réponse à un enrichissement en carbone dépend du microsite de sol et plus particulièrement de l'activité microbienne initiale (*i.e.* 'hot-spot' ou non). Afin de vérifier ces hypothèses, du sol non bioturbé et des turricules de vers de terre ont été mis en culture en présence de ^{13}C -glucose ou ^{13}C -acétate comme seule source de carbone et les ARNs ont été extraits tout au long de la consommation des substrats. Après fractionnement des ^{12}C -ARN et ^{13}C -ARN par ultracentrifugation, les communautés bactériennes actives (^{12}C -ARN) et celles étant intervenues dans la dégradation du substrat carboné (^{13}C -ARN) ont été analysées par T-RFLP. Outre la réponse aux questions posées initialement, cette expérimentation nous a permis de développer la technique de SIP à partir d'ARN en optimisant les conditions: substrats facilement métabolisables et sol mis en culture.

Après cette validation d'applicabilité de la méthode SIP-ARN aux microsites de sol, cette stratégie a été utilisée pour relier la fonction de dégradation de l'atrazine aux bactéries réellement impliquées dans ce processus dans du sol non bioturbé et dans des microsites de sol générés par la macrofaune lombricienne (parois de galeries et turricules). L'analyse des ^{12}C -ARNs nous a également permis d'identifier les bactéries actives dans les différents microsites de sol étudiés et de caractériser plus précisément l'impact de la bioturbation et de l'hétérogénéité qu'elle génère sur les bactéries du sol. Pour cela, de l'atrazine marquée au ^{13}C a été apportée sur les différents microsites de sols et après 2 et 8 jours d'incubation à 20°C les ARNs ont été extraits et ultracentrifugés. Les ARNr 16S présents dans les fractions légères (^{12}C -ARN) et lourdes (^{13}C -ARN) ont été amplifiés par RT-PCR, clonés et séquencés afin d'accéder à la diversité des bactéries actives et de celles impliquées dans la dégradation de

l'atrazine dans les différents microsites. Ces résultats sont présentés dans l'article 5 'Identification of atrazine-degraders under soil bioturbation by earthworms by RNA-SIP .

2. Short-term response of soil bacteria to carbon enrichment in different soil microsites (article 4)

Cécile MONARD¹, Françoise BINET¹ and Philippe VANDENKOORNHUYSE¹

¹CNRS / Université de Rennes, UMR 6553 'EcoBio, IFR2116/FR90 CAREN, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 RENNES Cedex, France

Soumis à **Applied and Environmental Microbiology** (Février 2008)

ABSTRACT

The fraction of bacteria responsive to carbon enrichment was studied by RNA-stable isotope probing with ^{13}C labeled glucose and acetate in two soil microsites that differed in 'hot spot' status, *i.e.* bulk soil and earthworm casts. The primary users of available carbon (primary consuming bacteria) were thus differentiated from the total living soil bacteria. First, glucose and acetate degradation kinetics in the two soil microsites were assessed and then RNA was extracted after enrichment with [^{13}C]glucose and [^{13}C]acetate. ^{12}C -RNA and ^{13}C -RNA were separated by ultracentrifugation and the active bacteria in each fraction were compared by T-RFLP analysis of the 16S rRNA gene. Both soil microsite status and carbon enrichment were shown to rapidly select for different active bacterial communities which resulted in different degradation kinetics. Carbon substrate had a greater effect than soil microsite on the structure of the active bacterial communities, although both were shown to interact together. As indicated by the higher specific richness and diversity found in glucose-enriched soil, the indigenous bacteria consuming glucose were more diverse than those consuming acetate. The primary glucose-consuming bacteria were a fraction of the total living soil bacteria in both soil microsites. However, a newly selected fraction of bacteria, little represented in the total living bacteria, was detected in the acetate-enriched casts and related to an enhanced acetate degradation rate. This confirmed the 'hot spot' status of the earthworm casts in which certain dormant bacteria became activated and/or poorly represented active bacteria were numerically enhanced compared to the bulk soil.

INTRODUCTION

Soil is a complex heterogeneous system that comprises a variety of microhabitats with different physicochemical characteristics and discontinuous environmental conditions (38). It thus sustains an immense diversity of microorganisms. One gram of soil may harbor up to 10 billion microorganisms of possibly thousands of different species (30) but, in general, less than 5% of the overall available space in soil is occupied by living microorganisms (27). However, zones of increased biological activities defined as 'hot spots' and characterized by more favorable physicochemical properties or organic matter enrichments are present in soils (27). The rhizosphere is considered as a 'hot spot' for microorganisms as plant root growth modifies soil structure and exudates secretion supplies organic nutrients (21). Earthworms, by their activity in soils, are also providers of such 'hot spots' (7). Whereas most soil bacteria are in a state of dormancy (27, 35, 39) soil bioturbation by earthworms has been shown to increase soil bacterial activity (3, 31). Bioturbation acts on bacterial communities by modifying both the physical and chemical properties of soil (23). For instance, soil burrowing as well as the deposition of casts in soil changes the pore space (pore network) that can be inhabited by bacteria (2, 33). There is also clear evidence that moisture and nutrient (total and organic carbon, total and mineral nitrogen and available phosphorus) contents are increased in excreted soil compared to uningested soil (9, 10, 13, 24).

Although soil is a major reservoir of organic carbon in earth and an important habitat for microorganisms (45), the available carbon concentrations are low and certainly among the major factors limiting bacterial growth in soil (1, 11). This limited availability of carbon is likely a major determinant of the bacterial community structure and function in soil (6). Thus carbon amendments have been used as a tool to study soil microbial activity or diversity. For instance, glucose has been added to measure the size of the soil microbial biomass and to determine the proportion of growing and non-growing microorganisms. Active (r) and dormant (K) fractions of the glucose-responsive biomass in soil have been quantified as well as the rate of transition between the two physiological states (35). Soil enrichments with simple carbon substrates such as acetate, propionate, benzoate, cellobiose, glucose, arginine, tryptone and leucine were also used to maximize bacterial diversity in soil cultures. Wawrik et al. (43) showed that dissimilar carbon sources select for dissimilar culturable bacterial communities and they concluded that the greatest possible diversity of growth substrates must be used to isolate the maximum possible bacterial diversity from soil. By adding ^{13}C -acetate

to soil, Bohlen et al. (5) showed that soil microbial growth and assimilation of this substrate increased in earthworm middens in relation to surrounding soil. However the authors did not assess the diversity of acetate-consuming bacteria in the soil microsites. The papers published so far have reported the global response of soil microorganisms to an added substrate in terms of microbial activity, biomass or diversity. But it seems from the literature that the active microbial fraction that directly consumes the added carbon substrate, *i.e.* the primary users has rarely been investigated.

The aims of the work presented herein were to examine in depth the responses of soil bacteria to available carbon enrichment by discriminating the primary users from the total living soil bacteria. This was made possible by using the RNA-SIP strategy with ^{13}C labeled substrate. The SIP approach, initially applied to DNA, can now be successfully used with RNAs which are considered as more responsive biomarkers in that they are continuously synthesized by all living cells (25). Glucose and acetate were used as model substrates since these molecules are readily utilized and known to be metabolized through different metabolic pathways (44). We hypothesized i) that different carbon substrates initiate different short-term responses of the living soil bacterial communities but ii) that the short-term response to carbon enrichment depends also on the 'hot spot' status of the soil microsite (*i.e.* bulk soil or earthworm casts).

MATERIALS AND METHODS

Soil microcosms. Soil was collected from the top 0-30 cm horizon layer at the agricultural site of the National Institute of Research in Agronomy (Epoisses, France). This soil was a clay loam (sand 6.7%, silt 47.2%, clay 46.1%) with a pH of 6.7. The collected fresh soil was sieved through 4 mm mesh and stored at 4°C until used. Soil microcosms were prepared as described by Binet and Trehen (4). Each microcosm (PVC cylinder; 15 cm high, 10 cm diameter) was filled with 1800 g of 4 mm-sieved fresh soil (water content of 22% *w/w*). The soil in each microcosm was compacted to a bulk-density of 1.53 g cm⁻³. The microcosms were placed in a climate chamber at 12°C under a 12h:12h night/day photoperiod. After 2 days, 3 adult specimens of the earthworm species *Lumbricus terrestris* were added to the soil surface to give a total average biomass of 12 +/- 0.3 g per microcosm. Every 3 days, the earthworm surface-casts were harvested and stored at -20°C until used and

twenty-six days after earthworm addition, the soil microcosms were destroyed. The bulk soil not burrowed by earthworms was sampled and stored at -20°C until used.

Degradation kinetics and ^{13}C -enrichment. First the kinetics of glucose and acetate degradation were measured. Five grams of soil (bulk soil or casts) were suspended in 50 ml of a mineral salt medium (36) and placed at 30°C and 150 rev min⁻¹. Glucose or sodium acetate (2.4 g C per g) was added as sole carbon substrate after solution sterilisation by filtration at 0.2 µm. Glucose degradation was followed spectrophotometrically using the EnzyPlus kit (Diffchamb AB, Gothenburg, Sweden) and acetate degradation was measured by ionic chromatography (Dionex DX 120). For the ^{13}C -labeled experiments, [^{13}C]glucose (>98%, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) or [^{13}C]acetate (>99%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were added to soil samples as described above. Three millilitres of soil solution were sampled regularly from 5 to 24h of incubation, centrifuged 10 min at 10,000 × g and the pellets were stored at -20°C until RNA extraction. Additional control experiments were performed with unlabeled [^{12}C]substrates to check for absence of ^{13}C -RNA in the heavy fraction of the density gradient.

Soil RNA extraction. RNA was extracted from soil pellets according to Courty et al. (P. E. Courty, M. Poletto, F. Duchaussoy, M. Buée, J. Garbaye, F. Martin, submitted for publication) by first bead-beating at 1,800 rev min⁻¹ for 3 min in presence of 0.5 g of 106-µm-diameter glass beads (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 30 µl of SDS 20%, 170 µl of a diatomaceous solution and 580 µl of TE saturated phenol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). After centrifuging at 14,000 × g for 15 min at 4°C, the supernatants were incubated over night at -20°C with 0.1 volume of 3M sodium acetate and 2 volumes of ethanol. After centrifugation at 14,000 × g for 10 min at 4°C the pellet was resuspended in 25 µl of ultrapure Dnase- and Rnase-free water. RNA was then extracted and purified with the Qiagen RNA/DNA Minikit and Rneasy Plant Mini kit (RNA Cleanup) according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). RNA was quantified at 260 nm and RNA purity was estimated by calculating the ratio between the absorbance at 260 nm and 280 nm (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). RNA aliquots were stored at -80°C.

Density gradient centrifugation and fractionation. The isopycnic ultracentrifugation was performed with 50 ng of purified RNA according to Vandenkoornhuyse et al. (41). Representative fractions of unlabeled (light density fraction) and ^{13}C -labeled (heavy density fraction) RNA were taken along the ultracentrifugation

gradient. Each RNA fraction was then precipitated with two volumes of isopropanol. After centrifugation, the pellets were washed in 75% ethanol, dried and redissolved in 25 µl of ultrapure water (Invitrogen, Carlsbad, CA).

RT-PCR. The presence of ^{12}C -RNA and ^{13}C -RNA in the light or heavy fractions of the density gradient were checked by performing RT-PCRs on a 4 µl aliquot of each light and heavy RNA fraction, using the Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The reaction was carried out in a final volume of 50 µl with 10 pmol of the primers Eub_519f and Eub_1390r specific for bacteria (28) modified by Vandenkoornhuyse et al., 2007 (41). The thermal cycling conditions consisted of a reverse transcription at 51°C for 30 min followed by PCR amplification with 2 min denaturation at 94°C and 35 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at 52°C and 50 sec at 68°C, ending with a final extension step for 10 min at 68°C. The presence and size of each RT-PCR product (870 pb) were checked by electrophoresis on 1% agarose gel.

T-RFLP. RT-PCRs were performed as described previously with the Eub_519f primer labeled in 5' with carboxyfluorescein (6-FAM) and the Eub_1390r primer labeled in 5' with the hexa-chloro derivative (HEX). The size of each RT-PCR product (870 pb) was checked by electrophoresis on 1% agarose gel. Labeled RT-PCR products were purified with the High pure PCR product purification kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and eluted in 40 µl of elution buffer. The level of resolution of the T-RFLP method is greatly improved by using more than one restriction enzyme to generate a higher polymorphism of terminal restriction fragments (T-RFs) at both labeled ends (22). Thus, 20 microliters of purified labeled PCR products were independently digested with 2 units of the restriction enzymes *StyI* or *HinfI* (Promega, Madison, WI). Digests were precipitated at -20°C overnight with 0.1 volume of sodium acetate 3M and 2 volumes of ethanol. After centrifugation the pellets were washed in 70% ethanol, dried and resuspended in 10 µl of ultrapure water. Nine microliters of a 400HD ROX/formamide solution (the internal standard ladder) (Applied Biosystems, Foster City, CA) were added to 1 µl of resuspended pellets. The T-RFs were separated and accurately sized using an automated sequencer (model ABI3130xl, Applied Biosystems, Foster City, CA). To check that all the fragments detected were true T-RFs even if they were of low intensity, two independent RT-PCRs, restriction digestions and separation were performed on all the samples. The T-RFs sizing and diversity signature analysis were performed using the Peak Scanner 1.0 software (Applied Biosystems, Foster City, CA). Only the length of the T-RFs was taken into account for data analyses (presence/absence of a T-RF)

as we had noticed that the peak intensity was not conserved between true replicates. Thus, each T-RF was coded as a discrete variable (0 for absence or 1 for presence) (22, 42).

Analyses of T-RFLP data. The bacterial communities in bulk soil, casts and after glucose or acetate addition were compared by computing a parsimony tree with PAUP 4.0β10 (Sinauer Associates, Sunderland, MA) as described by Vandenkoornhuyse et al. (40). The shortest topology found was calculated by using a heuristic tree search with 500 replicates of random addition and the TBR swapping algorithm. The bootstrap values, estimated from 1000 replicates, represented the percentage of identical topology for a given node.

A multivariate approach based on principal component analysis (PCA) was also used and the covariance PCAs of the data were computed. All the PCAs were implemented with the ADE-4 software package.

Specific richness (S) was estimated as the total number of T-RFs and bacterial diversity was based on Shannon's information measure, H_0 , which was calculated as follows: $H_0 = - \sum p_i \log_2 p_i$, where p_i is the frequency of a given T-RF fragment. H_0 is lowest ($=0$) when all the individuals belong to the same species or when all species are represented by a single individual and H_0 is highest when all the individuals are equally distributed between the species. S and H_0 were calculated at different levels for each soil microsite: the total active bacteria including the one not directly induced by substrate addition (^{12}C -RNA) and the bacteria consuming the substrate (^{13}C -RNA).

RESULTS

Substrate degradation kinetics. The glucose and acetate added to the soil were rapidly consumed and no longer detected after 30 hours of incubation (Fig. 1). Glucose degradation was faster in casts than in bulk soil, the glucose completely disappearing after 20 hours compared with 30 hours in bulk soil (Fig. 1A). With acetate enrichments, a lag period of 19 hours of incubation before the occurrence of degradation was detected in casts but not in bulk soil. Despite this lag phase, the acetate degradation rate in casts was finally faster than in bulk soil and acetate was consumed within an identical incubation period (Fig. 1B).

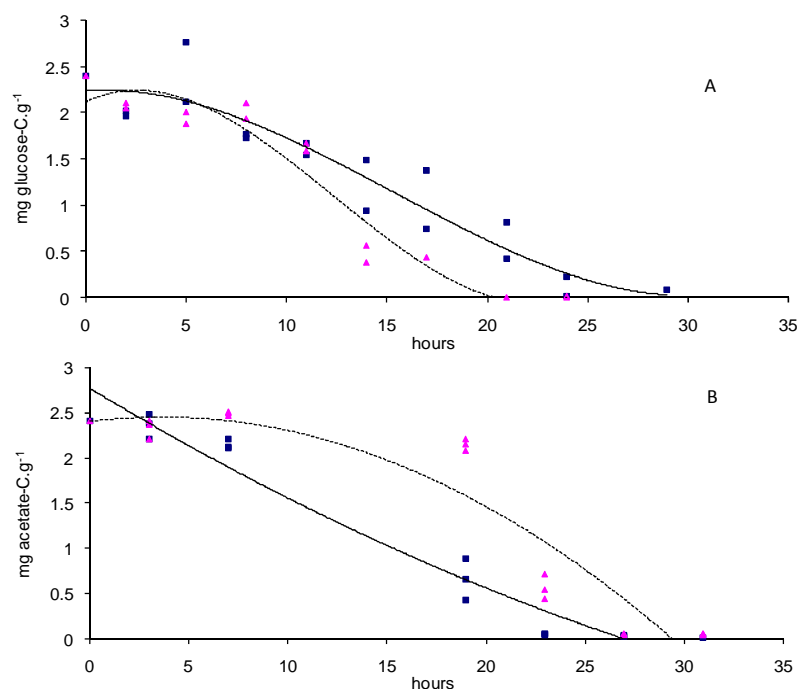


Figure 1: Glucose (A) and acetate (B) degradation curves in bulk soil (straight line) and earthworm casts (dot line) after addition of 2.4 mg substrate-C g⁻¹.

At the same time as degradation of the ¹³C-labeled substrates, ¹³C enrichment of RNA in the heavy density fraction was detected by RT-PCR throughout substrate degradation. For example, in bulk soil with [¹³C]acetate enrichment, ¹³C-RNA could already be detected after 5h of incubation with a maximum yield of RT-PCR products after 19 h of incubation (Fig. 2).

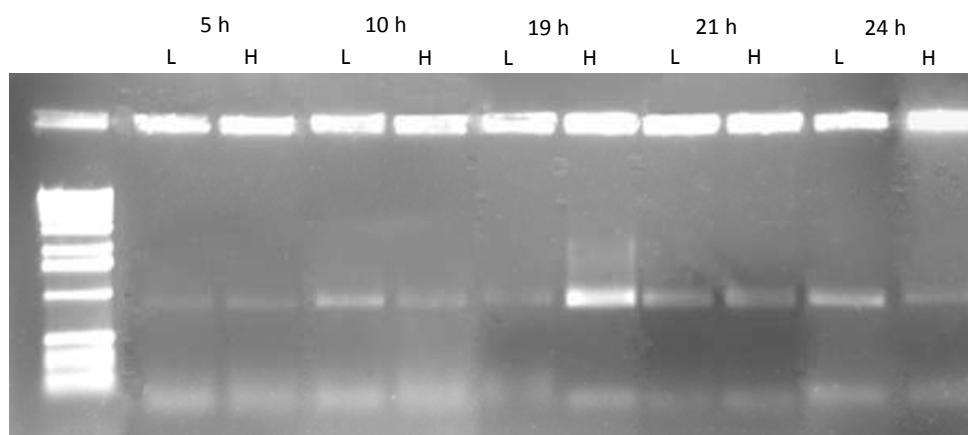


Figure2 : RT-PCR products from ¹²C- (light L) and ¹³C- (heavy H) RNA collected from the isopycnic density gradient RNAs were extracted from bulk soil in acetate enrichment after 5, 10, 19, 21 and 24 hours of incubation. Nucleic acids were amplified by RT-PCR with primer specifics for eubacteria.

Active bacterial community structure in relation to soil microsite. The bacterial communities in bulk soil and casts with [^{13}C]glucose or [^{13}C]acetate addition were compared by PCA analysis (Fig. 3). The active fraction of bacteria in the casts differed substantially from those in bulk soil with both enrichments. Discrimination depending on the soil microsite was greater with acetate enrichment as supported by the first principal component.

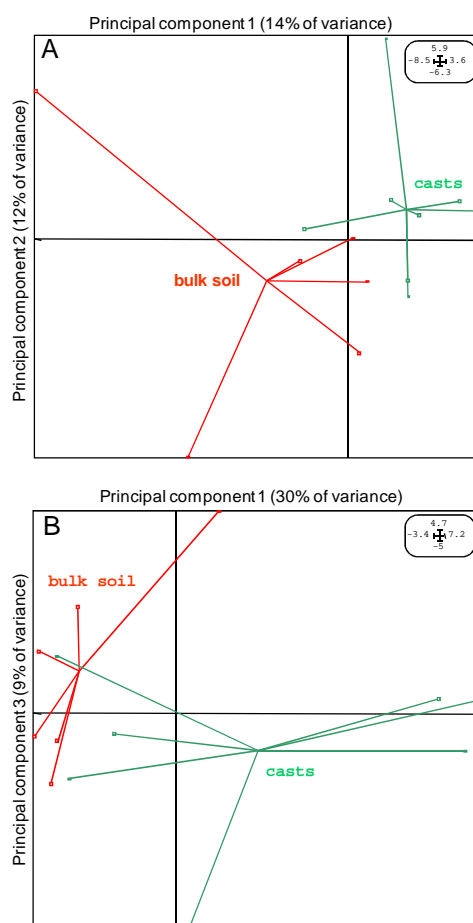


Figure3 : Principal component analysis (PCA) of the active bacterial communities. Each dot in the vectorial space represents the diversity signatures (T-RFLP profiles) of a given sample. Bacterial communities in soil microsites after glucose (A) and acetate (B) enrichments.

Specific richness (S) and diversity (H_0) of the total active bacteria (^{12}C -RNA) differed between the two soil microsites depending on the substrate added. S and H_0 were higher in bulk soil than in casts after the addition of glucose but not of acetate (Table 1).

TABLE 1 : Specific richness (S) estimates as the total number of T-RFs and diversity estimates with Shannon's information measure (H_0) in acetate and glucose enrichments ($n=6$ for each enrichment). H_0 and S of ^{12}C -RNA and ^{13}C -RNA in bulk soil and casts respectively.

Substrate	Soil microsite	^{12}C -RNA		^{13}C -RNA	
		S	H_0	S	H_0
Glucose	Bulk soil	303	8.13	184	7.4
	Casts	238	7.76	181	7.34
Acetate	Bulk soil	187	7.4	130	6.87
	Casts	219	7.62	257	7.89

Active bacterial community structure in relation to carbon substrate. The complete T-RFLP data (glucose and acetate enrichments) were plotted together to examine the impact of carbon substrate on the structure of the active bacterial community. The impact of bioturbation on active soil bacteria was still observed (Fig. 4A). Discrimination depending on the soil microsite was supported by the third principal component (Fig. 4A). The active bacteria were also distributed according to the substrate added indicating that substrate addition led to a modification in the structure of the active bacterial community (Fig. 4B). Discrimination depending on substrate enrichment was supported by the first principal component. In both microsites S and H_0 were higher in glucose-enriched soil than in acetate (Table 1).

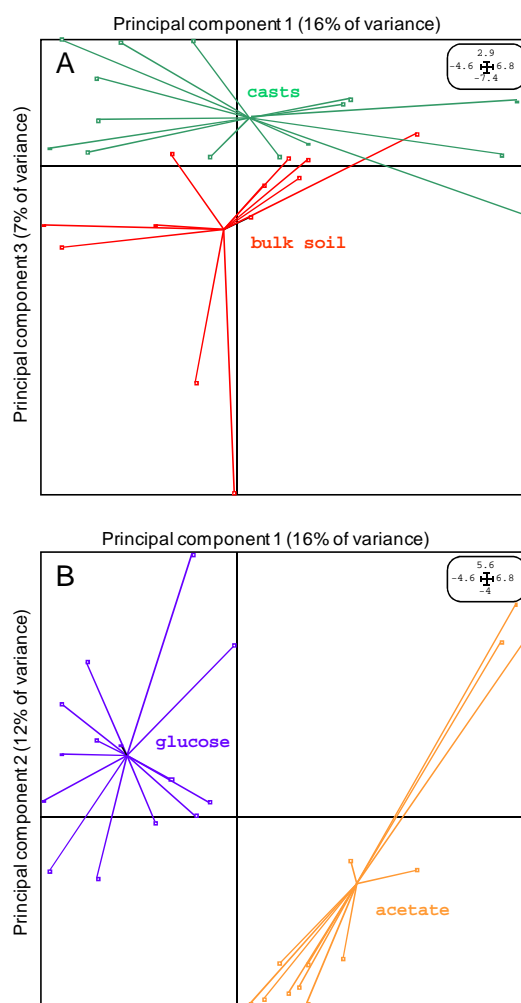


Figure 4 : Principal component analysis (PCA) of the active bacterial community. Each dot in the vectorial space represents the diversity signatures (T-RFLP profiles) of a given sample. Bacterial communities according to the soil microsite status and irrespective of the substrate added (A) and according to the substrate added and irrespective of the status of the soil microsite (B).

Carbon substrate consumption by active soil bacteria. The RNA-SIP method allowed the active consuming bacteria to be distinguished from the total living soil bacteria. Parsimony analyses were performed on ^{13}C -RNA solely (Fig. 5). These analyses demonstrated that the composition of the bacterial community was specific to the nature of the added carbon substrate (Fig. 5). Bacterial community structure was greatly modified by carbon addition. Comparison of S and H_0 in ^{12}C -RNA and ^{13}C -RNA revealed differences between the acetate and glucose enrichments in the two soil microsites (Table 1). After glucose enrichment, the diversity of the consuming bacteria (^{13}C -RNA) was less than that of the total living soil bacteria (^{12}C -RNA) irrespective of the soil microsite, even if this difference was lower in casts (Table 1). After acetate enrichment, the consuming bacteria

(^{13}C -RNA) were also less diverse than the total living bacteria (^{12}C -RNA) in the bulk soil but not in casts, in which the acetate-consuming bacteria showed greater diversity.

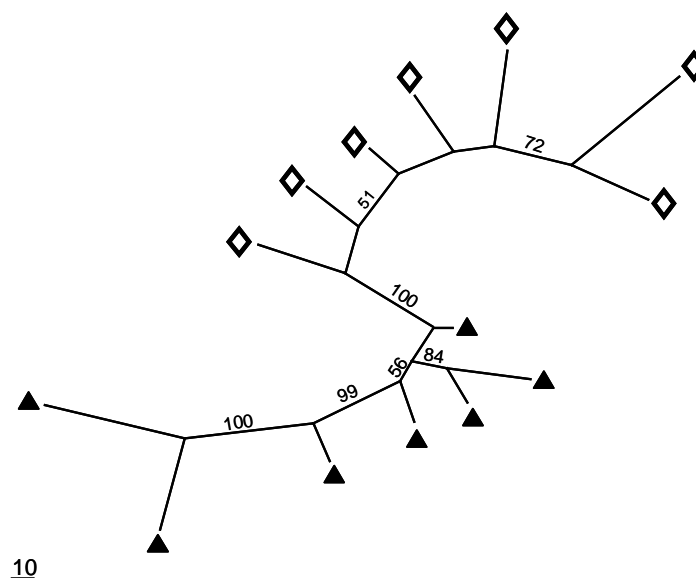


Figure 5: Unrooted maximum parsimony tree showing differences in the composition of soil bacterial communities in ^{13}C labeled fractions of glucose (diamond) and acetate (triangle) enrichments.

DISCUSSION

In this study we analyzed the communities of living soil bacteria and addressed the short-term response to carbon supply in two kinds of soil microsites, with or without ‘hot spot’ status.

We know that the diversity of bacteria in soil is huge (e.g. 37). We also found a great diversity of living bacteria in soil under our experimental conditions, with at least 47 to 76 different SSU rRNA targets coamplified (*i.e.* 187/4 and 303/4, Table 1, given the fact that 2 enzymes were used and the 2 strands analysed) from an aliquot of 50 ng of RNAs extracted from 300 mg of soil. This is one of the very first estimates of the number of different living soil bacterial genomes co-occurring in a given soil sample.

By using the RNA-SIP/T-RFLP strategy, like others recently (26), we clearly highlighted a rapid differentiation within the soil bacterial communities which indicated that these molecular tools allowed satisfactory resolution to assess the working hypotheses. We propose that this short-term response of the living bacteria could be attributed to removal of the trophic limitation in soil and this was clearly highlighted by using the RNA-SIP strategy. Furthermore, our results showed that with glucose and acetate enrichments, the active

bacterial communities were also structured according to the soil microsite. Thus we distinguished two selective factors that interacted together.

Firstly, the living bacteria were selected differently in earthworm casts and bulk soil (Fig. 3). Indeed, from ingestion to excretion, the soil is subjected to different modifications which tend to modify the bacterial communities. This can be attributed to the fact that earthworms feed selectively on material rich in organic matter and containing high concentrations of bacteria (14, 29) with the result that ingested soil differs from the bulk soil. The physical and chemical properties are then modified during passage through the earthworm gut. The gut has been described as a mobile anoxic microhabitat in aerated soil (14), containing high quantities of available organic compounds, such as glucose and acetate, which make it an ideal habitat for the anaerobic metabolism and fermentative processes of ingested soil microorganisms (14, 19, 20). Moreover, it is hypothesized that passage through earthworm guts increases the culturability of certain microorganisms in ingested soil (14). Furthermore, an increase in microbial respiration and bacterial counts was observed in casts (3, 9). Casts differ from bulk soil by higher moisture content, higher soluble organic carbon, higher nitrate and ammonium concentration, higher available phosphorus and higher nutrient availability which provide more favorable growth conditions for microorganisms (9, 12, 18, 24). All these factors help to change the structure of bacterial communities after soil ingestion, digestion and excretion. Our results are in agreement with previously published studies reporting the modification of bacterial communities in casts compared to bulk soil (15, 29). However our results are the first to show a differentiation between living bacteria according to soil microsite status. Previous studies compared bacterial communities in bulk soil and casts by *in vitro* isolation and by culture-independent PCR amplification of the 16S rRNA gene. The bacterial communities were shown to be different (15) with more CFU in casts than in soil (29) and selection of different groups of bacteria such as *Actinobacteria*, *Firmicutes*, γ -*Proteobacteria*, α -*Proteobacteria* and some *Bacteroidetes* (17, 32, 34).

As second selective factor, our results provided evidence that the nature of the carbon substrate added to soil resulted in profound, specific and rapid selection within the living bacterial community. This selection by carbon substrate had a greater effect than the soil microsite, although an interaction between the two was detected. Both substrate enrichments, in addition to removing trophic limitation, created novel environments which selected divergent bacterial communities. Glucose and acetate carbon are not assimilated by the same metabolic pathways. Glucose can be used in three different metabolic pathways: glycolysis,

the pentose phosphate pathway and the Entner Doudoroff pathway (44). All three pathways convert glucose to phosphoglyceraldehyde which is then oxidized to pyruvate via reactions that are shared by all three pathways. Although glycolysis is the main pathway, some bacteria rely completely on the pentose phosphate pathway for glucose catabolism and others (e.g. *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., *Thiobacillus* spp., *Xanthomonas* spp.) only on the Entner Doudoroff pathway that is widespread, particularly among the aerobic Gram-negative bacteria (44). A variety of microorganisms may also harvest energy by transforming glucose into fermenting products. The utilization of acetate as sole carbon source requires operation of the glyoxylate cycle to convert acetyl-CoA into anapleurotic and gluconeogenic compounds (8). Not all bacteria are able to grow with acetate as sole carbon source as some do not possess the enzymes involved in the glyoxylate cycle. However, a recent study has also revealed new pathways for the assimilation of acetate that do not involve the key enzyme isocitrate lyase (16).

Although glucose and acetate are readily metabolized, the different catabolic pathways can be expected to result in different degradation kinetics and involve different consuming bacterial communities. Our results clearly demonstrate this (Figs. 1 and 5) and are in agreement with Wawrik et al. (43) who showed in soil culture experiments that each enrichment with a different carbon source (which included glucose and acetate) captured unique parts of the total bacterial community in soil. Furthermore, the higher specific richness and diversity found in the glucose-enriched samples indicated that diverse soil indigenous bacteria consumed glucose rather than acetate (Table 1).

When RNA-SIP was used with ^{13}C -labeled substrates, the glucose-consuming bacteria were observed, as expected, to be fraction of the total living soil bacteria, in both soil microsites (Table 1). However, unexpected results were obtained for the acetate-enriched soil casts. In that particular microsite, both the specific richness and diversity of the active consuming bacteria were higher and the kinetics of acetate degradation were also enhanced (Fig. 1A). Thus, acetate enrichment associated with the specific physicochemical properties of casts together with the enhanced culturability of bacteria generated by the passage through earthworm guts (19, 32) might have activated dormant bacteria (*K* state, undetectable by RNA-SIP) and/or increased poorly represented bacteria (*i.e.* those only detectable by in depth sequencing). This new selected fraction of bacteria probably became more competitive and abundant when acetate was available. Wawrik et al. (43) observed that acetate, compared to the other carbon substrates tested, did not have a greater effect than the different soil types

tested on the composition of the bacterial community selected after enrichment. This is confirmed by our results which showed that even when acetate enrichment selected a fraction of the soil bacteria this selection still depended on the soil microsite tested. Both soil status (*i.e.* ‘hot spot’ or not) and carbon enrichment had a strong selective effect on the living bacterial community structure. Although glucose and acetate are readily assimilable carbon substrates, the use of RNA-SIP allowed us to distinguish the active consuming bacteria within the total living bacterial communities. The relative importance of this active soil bacterial fraction depended on both the substrate added and the soil status. RNA-SIP gave direct access to the ecological opportunist (*r*) bacteria which started to grow immediately after substrate addition in response to the removal of trophic limitations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by fundings from the CNRS –INSU institute (programme national de recherche Ecosphère Continentale et Côtière ‘EC2CO’) to FB and a grant from the council of ‘Région Bretagne’ to CM and FB. We particularly thank Dr D. Warwick for editing the English writing of the manuscript and Dr N. Bougon for help in T-RFLP data software acquisition and treatment. We also thank the technical support of the genotyping/sequencing platform of Ouest-Génopole and especially S. Coedel for her efficient assistance.

REFERENCES

1. **Alden, L., F. Demoling, and E. Baath.** 2001. Rapid method of determining factors limiting bacterial growth in soil. *Appl. Environ. Microbiol* **67**:1830-1838.
2. **Binet, F., and P. Curmi.** 1992. Structural effects of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on the soil-organic matter system: Micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biol. Biochem.* **24**:1519-1523.
3. **Binet, F., L. Fayolle, M. Pussard, J. J. Crawford, S. J. Traina, and O. H. Tuovinen.** 1998. Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biol. Fertil. Soils* **27**:79-84.
4. **Binet, F., and P. Trehen.** 1992. Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* **24**:1501-1506.
5. **Bohlen, P. J., C. A. Edwards, Q. Zhang, R. W. Parmelee, and M. Allen.** 2002. Indirect effects of earthworms on microbial assimilation of labile carbon. *Appl. Soil Ecol.* **20**:255-261.
6. **Bossio, D. A., and K. M. Scow.** 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol* **61**:4043-4050.
7. **Bundt, M., F. Widmer, M. Pesaro, J. Zeyer, and P. Blaser.** 2001. Preferential flow paths: biological 'hot spots' in soils. *Soil Biol. Biochem.* **33**:729-738.
8. **Clark, D., P., and J. Cronan, E.** 1996. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources, p. 343–357. *In* F. C. Neidhardt, R. C. III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. **Daniel, O., and J. M. Anderson.** 1992. Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passage through the gut of the earthworm *Lumbricus rubellus* hoffmeister. *Soil Biol. Biochem.* **24**:465-470.
10. **Decaëns, T., A. F. Rangel, N. Asakawa, and R. J. Thomas.** 1999. Carbon and nitrogen dynamics in ageing earthworm casts in grasslands of the eastern plains of Colombia. *Biol. Fertil. Soils* **30**:20-28.
11. **Demoling, F., D. Figueroa, and E. Baath.** 2007. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biol. Biochem.* **39**:2485-2495.

12. **Devliegher, W., and W. Verstraete.** 1995. *Lumbricus terrestris* in a soil core experiment: Nutrient-enrichment processes (NEP) and gut-associated processes (GAP) and their effect on microbial biomass and microbial activity. *Soil Biol. Biochem.* **27**:1573-1580.
13. **Devliegher, W., and W. Verstraete.** 1997. Microorganisms and soil physico-chemical conditions in the drilosphere of *Lumbricus terrestris*. *Soil Biol. Biochem.* **29**:1721-1729.
14. **Drake, H. L., and M. A. Horn.** 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Ann. rev. microbiol.* **61**:169-189.
15. **Egert, M., S. Marhan, B. Wagner, S. Scheu, and M. W. Friedrich.** 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiol. Ecol.* **48**:187-197.
16. **Ensign, S. A.** 2006. Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Mol. Microbiol.* **61**:274-276.
17. **Furlong, M. A., D. R. Singleton, D. C. Coleman, and W. B. Whitman.** 2002. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1265-1279.
18. **Haynes, R. J., P. M. Fraser, J. E. Piercy, and R. J. Tregurtha.** 2003. Casts of *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) and *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister) differ in microbial activity, nutrient availability and aggregate stability: The 7th international symposium on earthworm ecolog, Cardiff, Wales, 2002. *Pedobiologia* **47**:882-887.
19. **Horn, M. A., A. Schramm, and H. L. Drake.** 2003. The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1662-1669.
20. **Ihssen, J., M. A. Horn, C. Matthies, A. Gossner, A. Schramm, and H. L. Drake.** 2003. N₂O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1655-1661.
21. **Joergensen, R. G.** 2000. Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biol. Biochem.* **32**:647-652.

22. **Johnson, D., P. J. Vandenkoornhuyse, J. R. Leake, L. Gilbert, R. E. Booth, J. P. Grime, J. P. W. Young, and D. J. Read.** 2004. Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytol.* **161**:503-515.
23. **Lavelle, P., D. Bignell, M. Lepage, V. Wolters, P. Roger, P. Ineson, O. W. Heal, and S. Dhillon.** 1997. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. Soil Biol.* **33**:159-193.
24. **Le Bayon, R. C., and F. Binet.** 2006. Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biol. Biochem.* **38**:235-246.
25. **Manefield, M., A. S. Whiteley, R. I. Griffiths, and M. J. Bailey.** 2002. RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:5367-5373.
26. **Murase, J., and P. Frenzel.** 2007. A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environmental Microbiology* **9**:3025-3034.
27. **Nannipieri, P., J. Ascher, M. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara, and G. Renella.** 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**:655-670.
28. **Orphan, V. J., L. T. Taylor, D. Hafenbradl, and E. F. Delong.** 2000. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:700-711.
29. **Pedersen, J. C., and N. B. Hendriksen.** 1993. Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative and total bacteria. *Biol. Fertil. Soils* **16**:227-232.
30. **Rossello-Mora, R., and R. Amann.** 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:39-67.
31. **Schindler Wessells, M. L., P. J. Bohlen, D. A. McCartney, S. Subler, and C. A. Edwards.** 1997. Earthworm effects on soil respiration in corn agroecosystems receiving different nutrient inputs. *Soil Biol. Biochem.* **29**:409-412.
32. **Schonholzer, F., D. Hahn, B. Zarda, and J. Zeyer.** 2002. Automated image analysis and in situ hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. *J. Microbiol. Meth.* **48**:53-68.
33. **Shipitalo, M. J., and R. Protz.** 1989. Chemistry and micromorphology of aggregation in earthworm casts. *Geoderma* **45**:357-374.

34. **Singleton, D. R., P. F. Hendrix, D. C. Coleman, and W. B. Whitman.** 2003. Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* **35**:1547-1555.
35. **Stenstrom, J., K. Svensson, and M. Johansson.** 2001. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**:93-104.
36. **Topp, E., H. Zhu, S. M. Nour, S. Houot, M. Lewis, and D. Cuppels.** 2000. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2773-2782.
37. **Torsvik, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae.** 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:782-787.
38. **Torsvik, V., and L. Ovreas.** 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:240-245.
39. **Van Elsas, J. D.** 1993. Bacterial responses to soil stimuli, p. 55-79. *In* J. Kjelleberg (ed.), *Starvation in bacteria*. Plenum, New York.
40. **Vandenkoornhuyse, P., R. Husband, T. J. Daniell, I. J. Watson, J. M. Duck, A. H. Fitter, and J. P. W. Young.** 2002. Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol. Ecol.* **11**:1555-1564.
41. **Vandenkoornhuyse, P., S. Mahe, P. Ineson, P. Staddon, N. Ostle, J.-B. Cliquet, A.-J. Francez, A. H. Fitter, and J. P. W. Young.** 2007. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:16970-16975.
42. **Vandenkoornhuyse, P., K. P. Ridgway, I. J. Watson, A. H. Fitter, and J. P. W. Young.** 2003. Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Mol. Ecol.* **12**:3085-3095.
43. **Wawrik, B., L. Kerkhof, J. Kukor, and G. Zylstra.** 2005. Effect of different carbon sources on community composition of bacterial enrichments from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6776-6783.
44. **White, D.** 2007. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*, 3rd ed. Oxford university press, New York, NY.
45. **Whitman, W. B., D. C. Coleman, and W. J. Wiebe.** 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:6578-6583.

3. Identification of atrazine-degraders under soil bioturbation by earthworms by RNA-SIP (article 5)

Cécile MONARD¹ et par ordre alphabétique Françoise BINET¹, Barbara LE BOT², Oscar LIMA¹, René SEUX² and Philippe VANDENKOORNHUYSE¹

¹CNRS / Université de Rennes 1, UMR 6553 Ecobio, IFR 2116 / FR 90 CAREN, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 263 Avenue du Général Leclerc, 35042 RENNES cedex, France

²Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHSP), LERES, Avenue du Professeur Léon Benard, CS74312, 35043 Rennes cedex

ABSTRACT

Soil is a heterogeneous matrix composed of discontinuous microhabitats including ‘hot-spots’ that can be generated by earthworm bioturbation. Because bacterial communities are structured by the soil heterogeneity, soil pollutant biodegradation may also spatially vary at this microscale. Atrazine is a pesticide that has been worldwide used and that generates diffuse pollutions leading to bacterial adaptation and biodegradation. Thus it constitutes a good model to analyze the diversity of atrazine degraders among co-occurring but discontinuous soil microsites. By using RNA-based stable isotope probing (RNA-SIP) with ^{13}C -atrazine we identified from 16S rRNA sequencing the diversity of the total active bacteria (^{12}C -RNA) and the atrazine-degraders (^{13}C -RNA) in bulk soil and in different microsites generated by earthworms soil bioturbation. We determined that earthworm bioturbation greatly affected the active soil bacterial diversity with wide distribution among the phylotypes retrieved in the different soil microsites and significant less phylotypes detected in casts. Earthworm bioturbation also modified atrazine degradation and atrazine-degraders diversity. Burrow-linings constituted a ‘hot-spot’ for atrazine degradation with enhanced disappearance and as soon as, two days of incubation, presence of the primary degraders that were closely related to *Pelomonas aquatica*. The atrazine-degraders identified in the different soil microsites belonged to many different phylotypes indicating that the degrading genes involved might have been acquired by horizontal gene transfers. Interestingly, two degraders phylotypes were closely related to bacterial isolates known to degrade phenanthrene (*Pelomonas saccharophila* and *Massilia timonae*), a PAH with monooxygenase-dependant degradation as atrazine N-dealkylation. The efficiency of RNA-SIP to link bacterial diversity to atrazine degradation was verified by the recovery of two phylotypes closely related to known-atrazine culturable degraders in ^{13}C -RNA (*Ralstonia basilensis* M91-3 and *Pseudomonas* sp. ADP). According to our results, we suggest that enhanced atrazine degradation should be sustained by key atrazine-degraders rather than by high atrazine-degraders diversity.

INTRODUCTION

Since the beginning of the green-revolution of the second part of the 20th century different xenobiotics were applied to agricultural soils leading to diffuse pollutions (Pimentel, 1996). Despite these molecules were new in the environment, their recurrent use and subsequent increasing concentration in soils have induced selection pressure for microorganisms. As a consequence, a fraction of the soil bacteria became adapted and so able to use these pollutants as nutrient source and to degrade them. In that way, they naturally sustain soil detoxification and /or depollution. This adaptation and selection of soil bacteria to diverse pollutants derived from anthropic activities also have an ecological and biotechnological interest.

Among the molecules used in agriculture, atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) that belongs to the *s*-triazine family has induced diffuse pollutions worldwide. Its biodegradation has been investigated and several catabolic pathways and genes have been identified by isolation of degrading bacteria. Thus, as first degrading step atrazine can be dechlorinated to hydroxyatrazine or hydroxylated to deethylatrazine (DEA) and deisopropylatrazine (DIA) by bacterial monooxygenase. (Giardina et al., 1982; Mandelbaum et al., 1993). It has been shown that atrazine biodegradation can be carried out by individual strains of bacteria such as *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995), *Nocardioides* sp. C190 (Topp et al., 2000a), *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai et al., 2003), *Aminobacter ciceronei* C147 (Topp et al., 2000b), *Chelatobacter heintzii* (Rousseaux et al., 2001) and *Ralstonia basilensis* M91-3 (Radosevich et al., 1995). However catabolic pathway implying bacterial consortia should be more common in soils than ones implying individual atrazine-degrading species (Smith and Crowley, 2006), and different atrazine degrading consortia of 2 to 8 bacterial members have been isolated and studied (de Souza et al., 1998b; Smith et al., 2005; Smith and Crowley, 2006; Chirnside et al., 2007; Kolic et al., 2007). Despite this better understanding of atrazine catabolism, we argue that the perception of atrazine degraders in soils is underestimated because all the knowledge up to date is solely related to culture-dependant strategies and we now know that only 10% or less of the soil bacterial diversity can be cultivated (Torsvik et al., 1998).

Soils consist on an heterogeneous matrix supporting different microhabitats (Ettema and Wardle, 2002) including desert areas and 'hot-spots', zones with high biological activity (Nannipieri et al., 2003). These 'hot-spots' can be generated or maintained by the universal

process of soil bioturbation that is the biological reworking of soil by inhabiting organisms such as roots and macrofauna including earthworms (Meysman et al., 2006; Monard et al., 2008). Thus, by disturbing the soil, earthworms generate different soil microsites that differ to the bulk soil in terms of microporosity, moisture, nutrient content or oxygenation (Pivet et al., 1995; Devliegher and Verstraete, 1997; Decaëns et al., 1999; Blanchart et al., 2004; Le Bayon and Binet, 2006). These soil property modifications associated to earthworm bioturbation impact the atrazine degradation by acting on atrazine transport (Sigua et al., 1995), atrazine bioavailability and distribution (Meharg, 1996; Binet et al., 2006) and atrazine-degrading genetic potential (Kersante et al., 2006; Monard et al., 2008). However, if earthworm bioturbation have been shown to modify the total soil bacterial structure and diversity (Furlong et al., 2002; Schonholzer et al., 2002; Kersante et al., 2006), its effect on the diversity of atrazine-degraders has never been studied yet.

To further understand linkage between soil heterogeneity, bacterial diversity and atrazine degradation four questions are addressed in the present paper: i) to what extent soil bioturbation by earthworm (*Lumbricus terrestris*) impacts diversity of total active soil bacteria? ii) What is the diversity of soil bacterial consortia involved in atrazine degradation and does it correspond to the knowledge of atrazine degraders in soils obtained by culture-dependent methods? iii) Do the patterns of atrazine degradation along with atrazine degrader consortia diversity differ among co-occurring but independent soil microsites generated by earthworms? And iv) Does the diversity of atrazine-degraders has to do with enhanced atrazine mineralization at the microsite scale? To address these questions, we used the RNA based stable isotope probing (RNA-SIP) approach which allows assessing of the total active bacteria and the fraction involved in atrazine degradation by following the C fate from ^{13}C -labeled atrazine to the *de novo* synthesized RNAs by atrazine degraders. This technique enables taxonomic identity to be linked with function (Wellington et al., 2003). Whereas relationship between diversity and ecosystem function have been shown to be complex and contradictory (Bengtsson, 1998; Schwartz et al., 2000; Griffiths et al., 2001), the objectives of the present study were to determine if at the microsite scale active bacterial diversity and/or atrazine degrader diversity sustain atrazine degradation.

MATERIALS AND METHODS

Soil microcosms

Soil was collected from the 0-30 cm top horizon layer at the agricultural site of the Institut National de Recherche en Agronomie (Epoisses, France). This soil was a clay loam (sand 6.7%, silt 47.2%, clay 46.1%) and had a pH of 6.7. The collected fresh soil was sieved at 4 mm and stored at 4°C until use. Soil microcosms were prepared as described by Binet and Trehen (1992). Each microcosm (PVC cylinder; 15 cm high, 12 cm diameter) was filled with 2280 g of 4 mm-sieved fresh soil (water content of 22% w/w). The soil in each microcosm was compacted to a bulk-density of 1.46 g cm⁻³. The microcosms were placed in a climate chamber at 15°C under a 12h:12h night/day photoperiod. After one day, 3 adult specimens of the earthworm species *Lumbricus terrestris* were added on the soil surface with a total average biomass of 8.2 +/- 0.3 g per microcosm. Every 2 days, earthworm surface-casts were harvested and stored à -20°C until use and twenty days after earthworm's addition, soil microcosms were destroyed. The bulk soil not burrowed by earthworms and the burrow-linings corresponding to the 2 mm thickness of soil carefully collected with a fine spatula from the sides of the entire burrow network were sampled and stored à -20°C until use.

Soil microsite experiments

The water content of the 3 soil microsites (bulk soil, burrow lining and casts) was adjusted to 0.5 g of water per g of dry soil (105°C) and 12 g of each moistened soil microsite was treated with 25 mg of atrazine (Chemical purity 98%, Syngenta Crop Protection, Switzerland) per gram of dry soil. The soil samples were then placed in a sterile glass jar at 20°C in the dark. At 20 days each soil microsite was treated with 25 mg of ¹³C-chain labeled atrazine (Chemical purity 97%, isotopic enrichment 98%, Innovation & Chimie Fine, France) per g of dry soil and placed in a sterile glass jar at 20°C in the dark. For each soil microsite, ¹³C-atrazine degradations were measured for 8 days and RNA was extracted after 2 and 8 days of incubation. Additional control experiments with unlabelled atrazine were performed on bulk soil to check the absence of ¹³C-RNA in heavy fraction of the density gradient.

¹³C- atrazine and metabolites degradation

¹³C-chain labeled atrazine was used preferentially to ¹³C-ring labeled as its mineralization into ¹³CO₂ have been shown to be smaller than the one of the ¹³C-ring labeled

atrazine probably as a result of assimilatory incorporation of the C of the side chains into bacterial biomass (Radosevich et al., 1996; Rousseaux et al., 2001). Thus ^{13}C -chain labeled atrazine was used to optimize ^{13}C incorporation into atrazine degraders RNA.

To follow atrazine degradation, ^{13}C -atrazine along with its metabolites (^{13}C -hydroxyatrazine, ^{13}C -DEA and ^{13}C -DIA) were measured in the soil microsites during the incubation. To do so, 250 mg of soil sample was dissolved in one liter of mineral water. After 15 min of ultrasound treatment, the sample was mixed during one hour and subject to 15 min of ultrasound treatment again. 50 ml of this mixture were harvested and diluted to 10 times. After shaking during 15 min, 5 ml were harvested and 10 μl of a methoprophyne solution (20 mg.l^{-1}) were added. Atrazine and its metabolites were selectively extracted from this water sample by solid phase extraction (SPE) with an Oasis hydrophilic-lipophilic balance (HLB) extraction cartridges (200 mg, 6 ml, Waters, St Quentin en Yvelines, France) pre-conditioned with 6 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ (60/40), 6 ml MeOH followed by 6 ml of ultra-pure water. Elution was carried out with 2 x 5 ml of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ (60/40). After this enrichment step, samples were evaporated under a gentle nitrogen stream close to a drop, and reconstituted with $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (90/10) acidified (0.1% formic acid), to reach a volume of 1 ml. This sample was analyzed by LC/MS and the HPLC system consisted of a Waters alliance 2690 (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France). Atrazine and metabolites were separated on a column X TerraTM MS C¹⁸, 150 x 2.1 mm, 3,5 μm particle size (Waters, Saint Quentin en Yveline, France) at 35°C. A binary mobile phase gradient (ultra pure water with 0.1% formic acid and CH_3CN with 0.1% formic acid) was used for pesticides separation. A simple quadrupole mass spectrometer model ZQ (Waters-Micromass, Saint Quentin en Yvelines, France) equipped with the electrospray (ES) source was employed coupled with HPLC. For each analyse, a value of the cone voltage was optimized by continuous infusion in order to achieve the highest sensitivity as possible. Analyses were performed at the LERES of the EHESP (Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes, France).

Soil RNA extraction

RNA was extracted from 250 mg of fresh soil after 2 and 8 days of incubation according to Monard et al.(submitted). The RNA pellets were washed with ethanol 75%, dried and resuspended in 50 μl of ultrapure Dnase- and Rnase-free water. RNA was quantified at 260 nm and RNA purity was estimated by calculating the ratio between the absorbance at 260 nm and 280 nm (NanoDrop Technologies). RNAs were aliquoted and stored at -80°C.

Density gradient centrifugation and fractionation.

The isopycnic centrifugation was performed with 50 ng of purified RNA according to Vandenkoornhuyse and collaborators (modified in Vandenkoornhuyse et al., 2007). Representative fractions of ^{12}C - (light density fraction) and ^{13}C -labeled (heavy density fraction) RNAs were taken along the ultracentrifugation gradient. Each RNA fraction was precipitated with two volumes of isopropanol. After centrifugation the pellets were washed in 75% ethanol, dried and redissolved in 25 μl of ultrapure water.

RT-PCR.

From ^{12}C -RNA and ^{13}C -RNA templates, RT-PCRs were performed from an aliquot of 4 μl of RNA using the Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche Applied Science, Germany). The reaction was carried out in a final volume of 50 μl with 10 pmol of the primers Eub_519f and Eub_1390r specific for bacteria (Orphan et al., 2000; modified in Vandenkoornhuyse et al., 2007).

Cloning and sequencing

The amplified fragments were ligated in the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI) and transformed into DH5 α Library efficiency[®] competent cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) by heat shock. Cells were grown in Luria-Bertani medium at 37°C overnight. The culture medium was supplemented with ampicilline (125 mg.L⁻¹), IPTG (0.1 mM) and X-Gal (20 mg.L⁻¹). From each clone library, from 135 to 219 positive clones were sequenced (Genoscreen, France) for both strands using T7 or SP6 primers. The two sequences were aligned and each nucleotide position was checked using Sequencher 4.6 (GeneCodes, Ann Arbor, MI).

Diversity and phylogenetic analyses

Rarefaction curves were computed for each data set (figures 1BC, 2CDE and 3BC). The number of species was quantified for 100 random combination of 1 to N sequences and also by performing 100 bootstrap pseudo-replicates implemented in Estimates (Colwell et al., 2004). Multiple alignments implemented with CLUSTALX (Thompson et al., 1997) were optimized by eye. Neighbor Joining phylogenetic reconstruction under the K2P model was calculated (CLUSTALX). PAUP 4.0 β 10 (Sinauer Associates) was used to compute the maximum parsimony (MP) tree by using a heuristic tree search with 500 replicates of random

addition, tree bisection and reconnection (TBR) as swapping algorithm. For the 1000 bootstrap pseudo replicates, 15 replicates of random-addition using the TBR swapping procedure were performed. Along with these phylogenetic reconstructions, the maximum likelihood (ML) tree was calculated using PAUP 4.0 β 10 using the GTR+I+G model with bootstrap estimates from 100 iterations. Modeltest 3.7 software was used to select the model.

RESULTS (cf tableau annexe 5 du manuscrit de thèse)

Total active bacteria in soil microsites

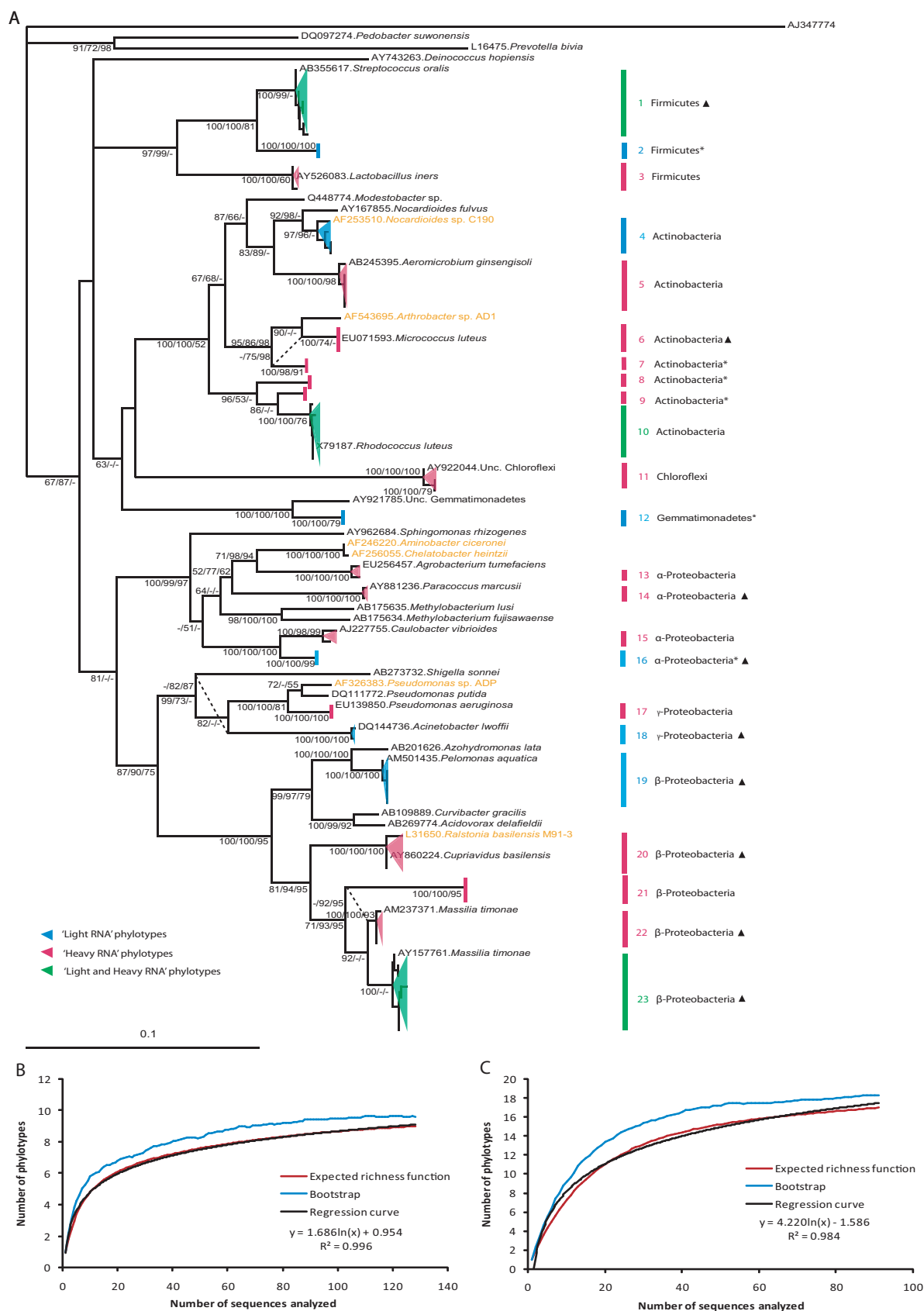
In bulk soil that represents the initial active bacteria in soil before earthworm bioturbation, three phylogenetic groups were dominant after 8 days of incubation: the *Firmicutes*, the *Actinobacteria* (phylotypes 4 and 10, highly similar to *Nocardioides* sp. C190 and *Rhodococcus luteus*) and the β -*Proteobacteria* (phylotypes 19 and 23, highly similar to *Pelomonas aquatica* and *Massilia timonae* AY157761) (Table 1, figure 1A). The *Chloroflexi* and *Gemmatimonadetes* phylogenetic groups were specific to bulk soil whereas the *Bacteroidetes* were detected in all soil microsites excepted in bulk soil after 8 days of incubation (Table 1). In burrow-linings, the α - (phylotype 25 highly similar to *Sphingomonas rhizogenes*), the β - (phylotypes 19, 37 and 23, highly similar to *P. aquatica*, *Acidovorax delafieldii* and *M. timonae* AY157761) and the γ -*Proteobacteria* were the dominant phylogenetic groups found (Table 1, figure 2B). In casts, *Firmicutes* and γ -*Proteobacteria* were no more detected but the *Deinococci* were specific to this soil microsite. The dominant phylogenetic groups in casts corresponded to the *Actinobacteria* (phylotype 6 highly similar to *Micrococcus luteus*) and the β -*Proteobacteria* (phylotypes 19, 42 and 22, closely related to *P. aquatica*, *Curvibacter gracilis* and *M. timonae* AM237371) (Table 1, figure 3A).

Table 1. Number of phylotypes, number of phylotypes estimated per g of dry soil and proportion of clone sequenced within bacterial phylogenetic groups retrieved in both ^{12}C - and ^{13}C -RNA (total) and in ^{13}C -RNA in each soil microsite. The proportion of clone sequenced from the ^{13}C -RNA in each soil microsite is expressed as percents of the total clones in the microsite.

	Burrow linings 2 days		Burrow linings 8 days		Bulk soil		Casts		Total	
	Total	^{13}C -RNA	Total	^{13}C -RNA	total	^{13}C -RNA	Total	^{13}C -RNA	Total	^{13}C -RNA
Phylotypes	9	1	19	15	23	17	10	8	42	30
Phylotypes per g of dry soil	51		109		125		56			
Phylogenetic groups (% of total library)										
Bacteroidetes			6.5				0.7	0.7	1.9	0.1
Actinobacteria			4.9	2.2	36.5	19.2	41.8	39.7	21.9	15.2
Firmicutes			2.7	2.7	12.8	5.9			4.8	2.6
Chloroflexi					1.8	1.8			0.6	0.6
Gemmatimonadetes					0.9				0.3	
Deinococci							0.7	0.7	0.1	0.1
Proteobacteria										
α-	6.7		28.1	14.6	3.2	2.3	4.8	4.8	10.9	5.7
β-	85.2	33.3	45.4	18.9	43.8	11.9	52.1	8.9	54.2	17.4
γ-	8.1		12.4	8.1	0.9	0.5			5.3	2.3
Total clones	135	45	185	86	219	91	146	80	685	302

Thus among all the phylotypes detected in the different soil microsite, the one closely related to *P. aquatica* (figures 1, 2 and 3, phylotype19) was detected in the ^{12}C -RNA of all the soil microsites whatever the incubation period.

Figure 1. A. Phylogenetic affinities of bacteria SSU rRNA sequences in bulk soil. The tree was computed by NJ (Scale bar: 0.1 substitutions per site) of all the bacterial sequences amplified from bulk soil after 8 days of incubation, with representatives of the highest BLAST hit of each phylotypes and known atrazine degrading bacteria in orange. The outgroup is an uncultured crenarchaeote (AJ347774). Bootstrap values are indicated at the nodes (NJ/MP/ML estimated from 1,000/500/100 iteration respectively). Phylotypes are presented with colors: blue, ^{12}C -RNA; pink, ^{13}C -RNA; green, sequences found in both ^{12}C - and ^{13}C -RNA. Asterisks indicate unknown phylotypes and triangles phylotypes shared between different soil microsites. B. Estimates of bacterial community diversity as a function of sampling effort for bulk soil sample at 8 days. Rarefaction curves are computed from 100 replicates of bootstrap (blue) and the expected richness function (red) is the number of phylotypes estimated (random sampling without replacement) from the sequences analyzed for ^{12}C -RNA. C. Estimates of bacterial community diversity for ^{13}C -RNA.



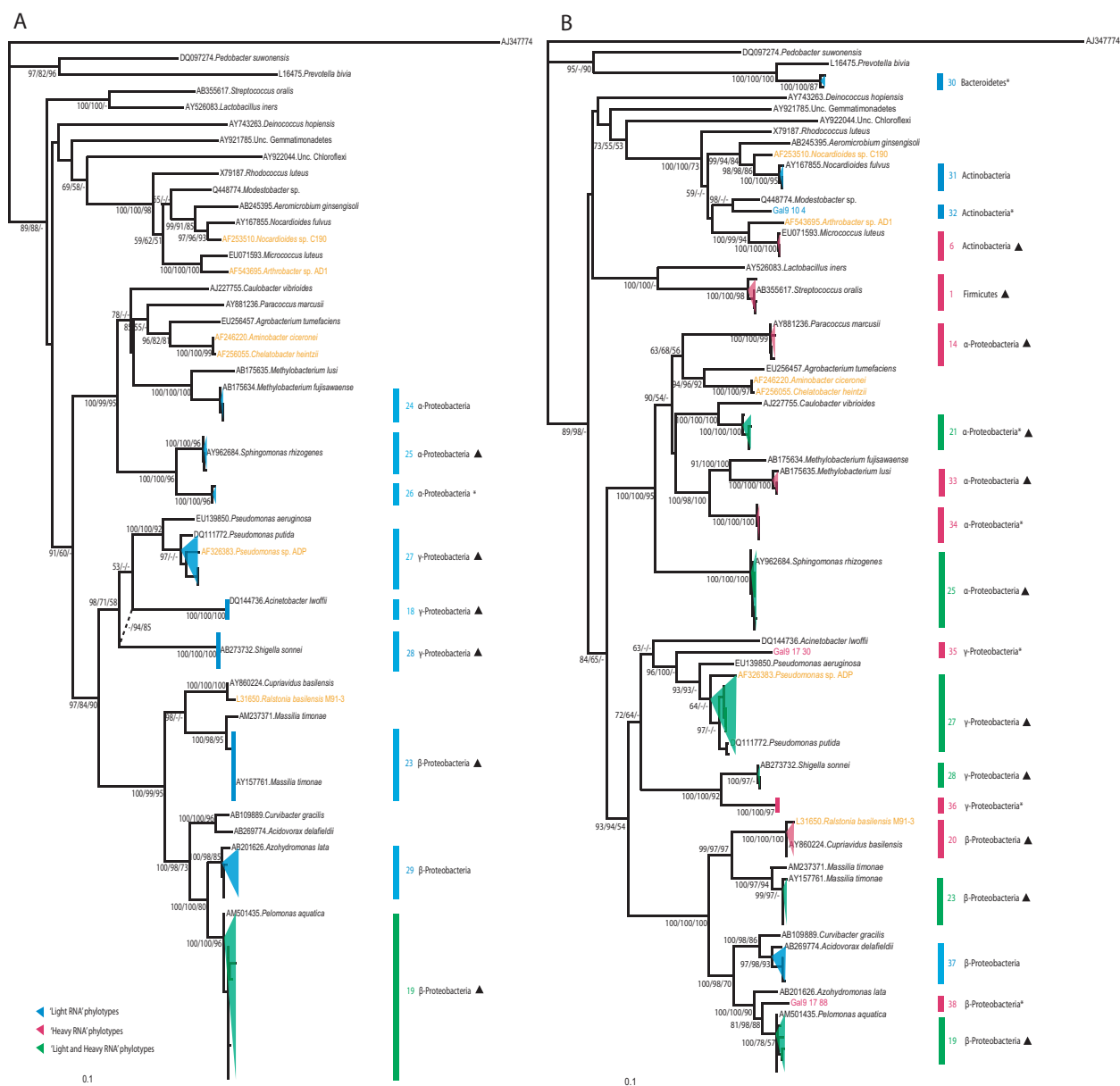


Figure 2. Phylogenetic affinities of bacteria SSU rRNA sequences in burrow linings after 2 (A) and 8 (B) days of incubation. The tree was computed by NJ (Scale bar: 0.1 substitutions per site) of all the bacterial sequences amplified from burrow linings, with representatives of the highest BLAST hit of each phylotypes and known atrazine degrading bacteria in orange. The outgroup is an uncultured crenarchaeote (AJ347774). Bootstrap values are indicated at the nodes (NJ/MP/ML estimated from 1,000/500/100 iteration respectively). Phylotypes are presented with colors: blue, ^{12}C -RNA; pink, ^{13}C -RNA; green, sequences found in both ^{12}C - and ^{13}C -RNA. Asterisks indicate unknown phylotypes and triangles phylotypes shared between different soil microsites. C. Estimates of bacterial community diversity for ^{12}C -RNA for burrow-linings sample at 2 days. D. Estimates of bacterial community diversity for ^{12}C -RNA for burrow-linings sample at 8 days. E. Estimates of bacterial community diversity for ^{13}C -RNA for burrow-linings sample at 8 days.

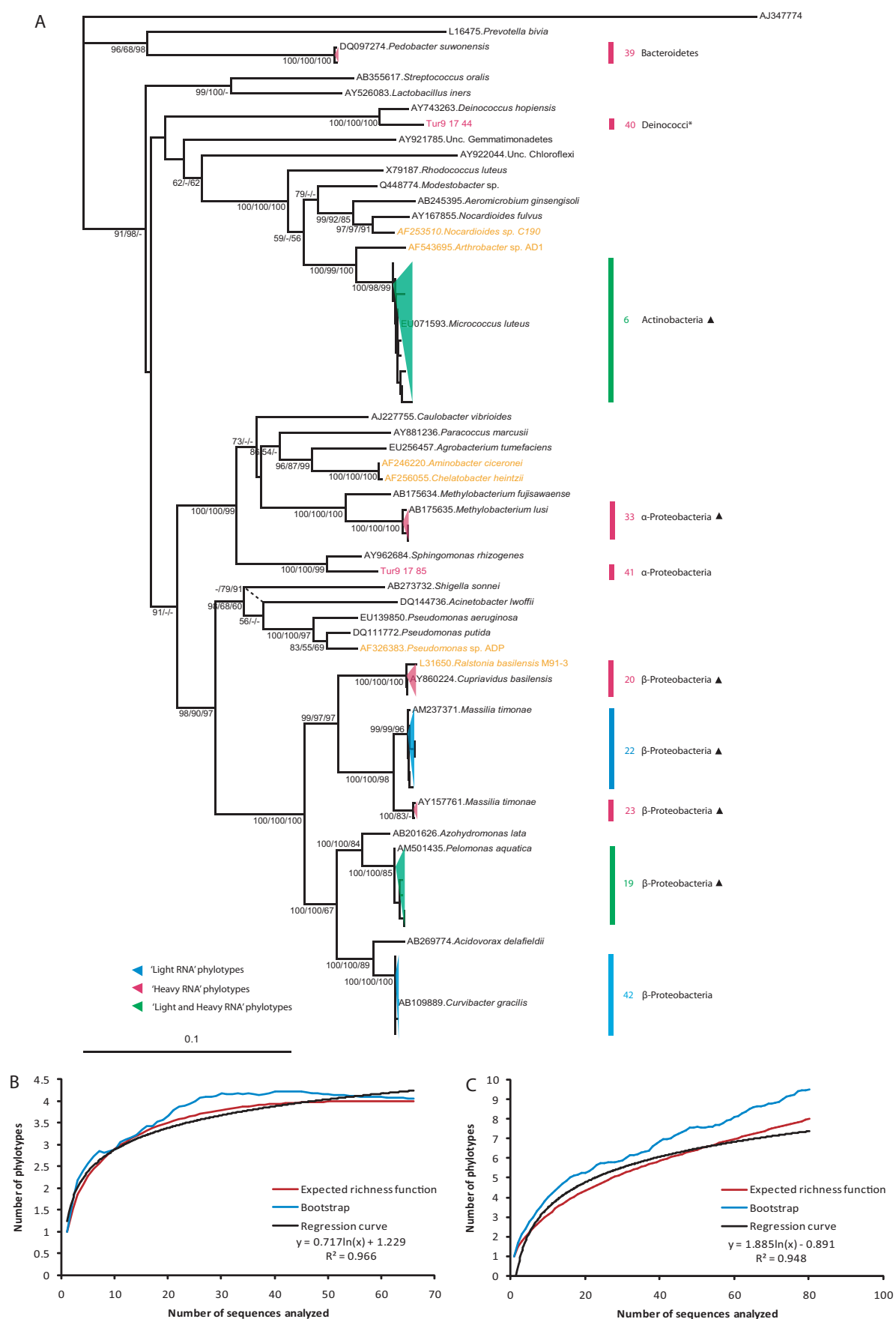


Figure 3. A. Phylogenetic affinities of bacteria SSU rRNA sequences in casts after 8 days of incubation. The tree was computed by NJ (Scale bar: 0.1 substitutions per site) of all the bacterial sequences amplified from casts, with representatives of the highest BLAST hit of each phylotypes and known atrazine degrading bacteria in orange. The outgroup is an uncultured crenarchaeote (AJ347774). Bootstrap values are indicated at the nodes (NJ/MP/ML estimated from 1,000/500/100 iteration respectively). Phylotypes are presented with colors: blue, ^{12}C -RNA; pink, ^{13}C -RNA; green, sequences found in both ^{12}C - and ^{13}C -RNA. Asterisks indicate unknown phylotypes and triangles phylotypes shared between different soil microsites. B. Estimates of bacterial community diversity for ^{12}C -RNA for surface casts sample at 8 days. C. Estimates of bacterial community diversity for ^{13}C -RNA.

^{13}C -atrazine degradation kinetics

^{13}C -atrazine degradation was faster in burrow linings than in bulk soil and casts (Figure 4). After 8 days, approximately two times less atrazine remained in burrow-linings compared to bulk soil and earthworm casts (11.9, 19.3 and 20.7 mg of atrazine per gram of dry soil respectively, figure 4). Whereas hydroxyatrazine and DEA were detected at low concentration in all microsites (0.25 mg and 0.17 mg per gram of dry soil at the most respectively, data not shown), DIA was not detected.

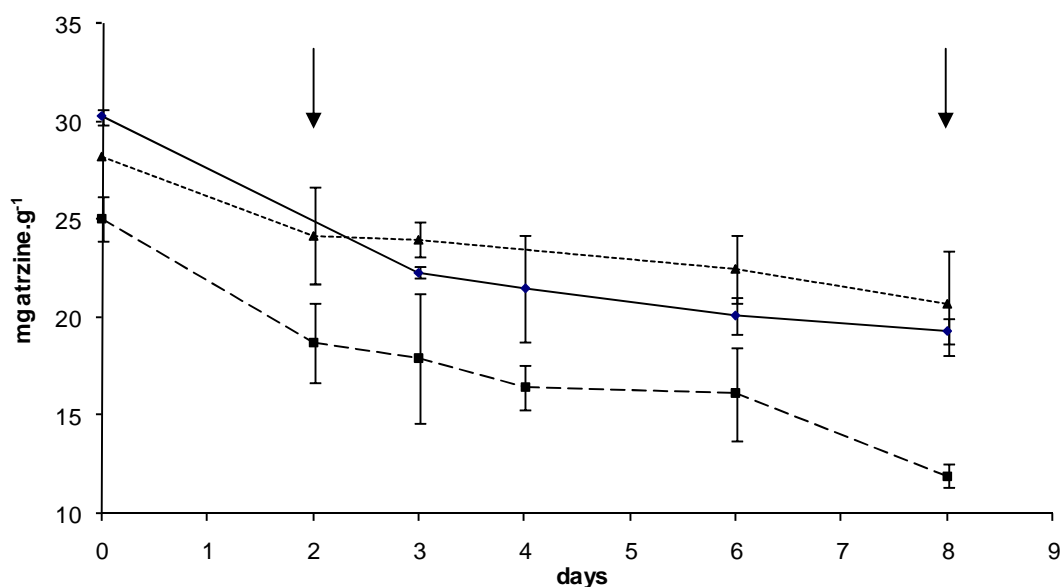


Figure 4: ^{13}C -chain labeled atrazine degradation kinetics in bulk soil (straight line), burrow linings (dash line) and earthworm casts (dot line). Arrows indicate the time at which RNA extractions were performed.

Atrazine-degraders in soil microsites

Relevant with the higher atrazine degradation (figure 4), ^{13}C -RNA was rapidly (at 2 days incubation) and solely detected in the burrow-linings. A single phylotype closely related to *P. aquatica* (figure 2A, phylotype 19) was found. Eight days following ^{13}C -atrazine

addition, ^{13}C -RNAs were detected in all soil microsites and corresponded to the same dominant phylogenetic groups as those of total active bacteria retrieved in the corresponding microsite but not compulsorily to the same phylotypes. In bulk soil *Actinobacteria* phylotypes retrieved in ^{13}C -RNA corresponded in majority to sequences closely related to *R. luteus* and *Aeromicrobium ginsengisoli* (figure 1A, phylotypes 10 and 5 respectively). In burrow-linings at 8 days, the α - (phylotypes 14 and 34, closely related to *Paracoccus marcusii* and an unknown phylotype), the β - (phylotype 19, closely related to *P. aquatica*) and the γ -*Proteobacteria* (phylotype 27, closely related to *Pseudomonas* sp. ADP) corresponded to the dominant phylogenetic groups detected in ^{13}C -RNA (figure 2B). In casts, the main phylogenetic group corresponded to the *Actinobacteria* with a phylotype closely related to *M. luteus* (figure 3A, phylotype 6).

Among all these phylotypes detected in ^{13}C -RNA, those corresponding to the species *Micrococcus luteus*, *Ralstonia basilensis* M91-3 and *M. timonae* AY157761, (figures 1A, 2B and 3A, phylotypes 6, 20 and 23 respectively) were detected in the ^{13}C -RNA of all the soil microsites at 8 days.

Total active bacteria vs atrazine-degraders

After 8 days of incubation, in all soil microsites, the atrazine degraders represented a fraction of the total active bacteria ranging from 42 % to 79 % and 80 % in bulk soil, burrow-linings and casts, respectively. However, many phylotypes were only detected in ^{13}C -RNA indicating high specificity to atrazine. This was particularly true in bulk soil and casts since 61 and 62 % respectively of all the phylotypes detected were specific to the ^{13}C -RNA whereas in burrow-linings it corresponded to 47 %.

DISCUSSION

Total active bacteria diversity in soil microsites

The bacterial diversity in soil is known to be huge since one gram of soil may harbor up to 10 billion microorganisms of possibly thousands of different species (Torsvik et al., 1990; Rossello-Mora and Amann, 2001). In bulk soil, our results indicated that 125 different phylotypes of active bacteria might be recovered from one gram of dry soil (Table 1). These phylotypes were highly diverse and belonged to variety of bacterial groups. Moreover 38% of

them were not related to known sequences indicating that a non negligible part of these soil bacteria has not been described previously (*i.e.* monophyletic phylotypes with homology to known 16S rRNA gene sequences below 97%). While in our experiments the most active soil bacteria in bulk soil belonged to the β -*Proteobacteria*, the *Actinobacteria* and the *Firmicutes* in importance order, previous study based on 16S rRNA clone library reported that 65% of all the bacterial ribosomes from an acidic grassland of the Netherlands were originated from *Firmicutes* and to a lesser extent to the α -*Proteobacteria* (Felske et al., 1998). In fact, the diversity of soil bacteria depends on environmental factors that generate different microhabitat associated to the spatial heterogeneity of soil matrix (Torsvik et al., 2002). In that way, our results showed precisely differences in active bacterial communities among the various soil microhabitats generated by earthworm bioturbation.

Whereas, by using culture dependent strategy, Furlong et al. (2002) shown that the bacteria isolated from burrows and soil are very similar and belong to the *Actinobacteria*, the *Firmicutes* and the α -, β - and γ -*Proteobacteria*, our results indicated that, the same phylogenetic groups were detected with *Bacteroidetes* on top of that in burrow-linings. However we observed significant differences in their predominance and at the phylotype scale high diversity was detected since only six phylotypes were common between bulk soil and burrow-linings. Tiunov and Dobrovolskaya (2002) reported changes in taxonomic composition of the culturable microbial community in burrows compared to bulk soil and our results indicated that active soil bacteria diversity is also modified as 8 phylotypes were specific to burrow-linings (figure 2B). These changes in active bacterial population should be due to the specific physico-chemical properties of burrow-linings as for example enrichment in NO_3^- and NH_4^+ (Binet and Trehen, 1992; Parkin and Berry, 1999), that might have stimulated *Pseudomonas* spp., known denitrifying bacteria (Cheneby et al., 2000), present in higher proportion in this microsite.

As previously described by Egert et al. (2004) by T-RFLP analysis significant differences between the bacterial communities in soil and casts were observed. The diversity of the active soil bacteria was greatly affected by passage through earthworm gut and excretion as only 10 different phylotypes were detected and *Firmicutes* were lost. This decrease of bacterial diversity is surprising as passage through earthworm guts have been shown to promote endospore germination (Drake and Horn, 2007). Nevertheless, this is consistent with the negative impact of earthworm soil digestion on the number of soil bacteria that has been recently observed by culture independent methods (Monard et al., 2008).

It is shown that earthworm bioturbation that generates heterogeneity in soil contributed to the maintenance of high bacterial diversity in soil as some bacterial phylogenetic groups were specific to soil microsites. As previously suggested by Wardle (2006), biotic interactions influence soil biodiversity as soil invertebrates promote dispersal and modify soil habitats of smaller sized organisms such as bacteria.

Considerations for the use of RNA-SIP

^{13}C -labelling of RNA at 8 days must be estimated with care as this labeled might be explained by different ways. First, the simplest explanation is that this ^{13}C -RNA belonged to bacteria that were able to degrade atrazine or its metabolites in a case of consortia. Secondly, ^{13}C -labeling of RNA can be explained by cross-feeding between bacteria but this labeled RNA may be principally located in intermediate buoyant density between light and heavy fractions (Radajewski et al., 2003). As the heavy fraction taken from the ultracentrifugation gradient corresponded to high ^{13}C enrichment level of RNA, sample of partially labeled RNA corresponding to ^{13}C incorporation via cross-feeding has been limited. Finally, bacterial RNA might be labeled through cometabolism by consumption of the ^{13}C -labeled ethyl and isopropyl side chains released during the atrazine degradation by other bacterial strain. However this hypothesis is not supported by our results as DEA and DIA were either not detected or detected at very few concentrations during the incubation indicating (i) no or too few liberation of ^{13}C labeled chains and/or (ii) intracellular degradation as proposed in the literature (Barriuso and Houot, 1996; Urlacher et al., 2004; Vaishampayan et al., 2007). According to these statements, we can estimate that the major part of the phylotypes retrieved in ^{13}C -RNA corresponded to atrazine degraders.

The efficiency of the SIP-RNA strategy is also supported by the fact that phylotypes highly similar to the strains *Ralstonia basilensis* M91-3 and *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995; Stamper et al., 2002), which are known atrazine-degraders, were detected in ^{13}C -RNA from different soil microsites.

Atrazine degrading bacteria

The atrazine-degraders identified in the present study belonged to a variety of phylotypes from several phylogenetic groups indicating that the genes involved in the atrazine degradation were likely acquired by horizontal gene transfers. Thus mobile genetic elements play a major role in the *in situ* spread and even *de novo* construction of catabolic pathways in

bacteria, allowing bacterial communities to rapidly adapt to xenobiotics (Top and Springael, 2003). Concerning atrazine, De Souza et al. (1998a) showed that the plasmid pADP1 found in the strain *Pseudomonas* sp. ADP and harboring the *atzA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E* and *-F* genes was self-transmissible to several Gram-negative soil bacteria. Martinez et al. (2001) analyzed the complete nucleotide sequence of this plasmid and showed that the genes encoding the initial reactions of atrazine degradation are not organized in an operon but are dispersed and flanked by transposases allowing independent transfers. Thus the atrazine catabolic genes can be recruited or lost independently and direct plasmid transfer may not be the only mechanism by which atrazine degradation genes are disseminated in the environment. Thus these insertion sequence elements have been found flanking the *atz* genes in other bacteria confirming that mobile gene cassettes have transferred between strains (Shapir et al., 2007).

Most of the phylotypes detected in heavy fraction were not observed in light fraction indicating they were not active or represented at a low number before atrazine addition. Their response to atrazine addition might have enhanced their activity and allowed us to detect them. We can speculate that these bacteria were tightly dependant of atrazine as nutrient source.

Burrow-linings form a special soil microsite for atrazine degraders as shown by Monard et al. (2008) and it has already been observed for 2,4-D degradation by Pivetz et al. (1995). They are enriched microhabitats as they contain higher organic matter, inorganic N and P, organic and total C and (Binet and Trehen, 1992; Parkin and Berry, 1999; Tiunov and Scheu, 1999; Jegou et al., 2001; Tiunov et al., 2001; Le Bayon and Binet, 2006). The 'hot spot' status of this soil microsite is further confirmed in the present study as i) the first atrazine degraders (phylotype 19, highly similar to the species *P. aquatic*, figure 2A) were detected rapidly in this microsite after 2 days of incubation and ii) atrazine degrading activity was improved in burrow-linings compared to the other soil microsite (figure 4). This increase may be due to more favorable physical and chemical conditions to soil bacteria that might have stimulated their activity and thus burrow-linings contained a larger fraction of metabolically-active microorganisms. We can speculate that the proportion of bacterial ecological opportunists *i.e.* in the *r* physiological state (Stenstrom et al., 2001) was higher in burrow-linings leading to an earlier and higher degradation of atrazine than in the other soil microsites. Then, this increased atrazine degrading activity might depends upon the presence of both efficiency consortia and individual strains able to completely degrade atrazine such as *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995) whose related phylotype has only been

detected in burrow-linings (phylotype 27, figure 2B). Moreover, *Pseudomonas putida* that belongs to the same phylotype has already been shown to harbor the *trzD* gene encoding an enzyme involved in atrazine degradation through transformation of the cyanuric acid into urea (Smith et al., 2005). Phylotype related to *R. basilensis* M91-3 (Stamper et al., 2002), another atrazine degrading bacteria, has also been detected in ^{13}C -RNA of all the soil microsites after 8 days of incubation (phylotype 20, figures 1A, 2B and 3A). This strain, isolated from a soil sample collected from a pesticide handling area on a farm (Radosevich et al., 1995) is able to mineralize atrazine and uses it as the sole source of carbon and nitrogen energy (Stamper et al., 2002).

P. aquatica*, *M. timonae* and *M. luteus

Among the atrazine-degraders retrieved in this study, most of them were unknown as involved in this function yet. The ones highly similar to the species *P. aquatica*, *M. timonae* and *M. luteus* (phylotypes 19, 23 and 6) called our attention.

First, the atrazine-degraders related to *P. aquatica* belonging to the class of β -*Proteobacteria* were the primary bacteria acting in the biodegradation as the sole rapidly detected two days after ^{13}C -atrazine addition. The strain *P. aquatica* has been isolated from industrial water in Sweden (Gomila et al., 2007) and is closely related to the strain *Pelomonas saccharophila* that has been studied as degrader of aromatic compounds such as phenanthrene, a PAH (Stringfellow and Aitken, 1995).

The phylotype closely related to *M. timonae* AY157761 belonging to the class of β -*Proteobacteria* has been detected in ^{13}C -RNA from all the soil microsites analyzed after 8 days of incubation with the ^{13}C -atrazine. This strain has been isolated from human (Lindquist et al., 2003) but *M. timonae* was also isolated from soil samples (Ferrari et al., 2005). A strain isolated from soil sample, closely related to *M. timonae* AY157761 (98% homology in the 16S rRNA gene sequence) can degrade phenanthrene. Thus phenanthrene catabolic enzymes might be involved in evolution of atrazine degradation through N-dealkylation by soil bacteria. Indeed, phenanthrene is mainly degraded by oxygenation of the aromatic rings catalyzed by a monooxygenase (Narro et al., 1992). However, the two monooxygenases implied in atrazine and phenanthrene degradation do not belong to the same enzymatic family (ExPASy, www.expasy.org).

The phylotype highly similar to *M. luteus* corresponded to the dominant atrazine-degrader and the sole *Actinobacteria* retrieved in earthworm casts. Interestingly, a bacterial

strain isolated from water samples and highly similar to *M. luteus* AJ409096 was able to grow in presence of atrazine and to degrade this molecule (López et al., 2005). However this strain has never been detected in *L. terrestris* casts yet.

Conclusion

The present paper showed that atrazine degradation function is sustained by different phylotypes of bacteria among which a fraction was unknown. Interestingly, most of these phylotypes have never been identified as atrazine-degraders before. By comparing the atrazine degradation kinetics and the number of phylotypes retrieved in ^{13}C -RNA after 8 days of incubation, no apparent relation was observed between bacterial diversity and the ecosystem function to which we were interested in. This atrazine degradation function does not seem to depend primarily to total atrazine-degrading bacterial diversity but most to key atrazine-degraders and physico-chemical conditions of the soil. Thus the soil spatial heterogeneity as the one generated by earthworm bioturbation is a main process in sustaining bacterial diversity. This diversity is also functional as key species in atrazine degradation were selected in specific microhabitats. The present study demonstrated that burrow-linings, by offering optimal physico-chemical conditions to specific key atrazine-degraders, constitute a ‘hot-spot’ for atrazine degradation

REFERENCES

- Barriuso, E., Houot, S., 1996. Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1341-1348.
- Bengtsson, J., 1998. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* 10, 191-199.
- Binet, F., Trehen, P., 1992. Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1501-1506.
- Binet, F., Kersante, A., Munier-Lamy, C., Le Bayon, R.-C., Belgy, M.-J., Shipitalo, M. J., 2006. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 1255-1263.
- Blanchart, E., Albrecht, A., Brown, G., Decaens, T., Duboisset, A., Lavelle, P., Mariani, L., Roose, E., 2004. Effects of tropical endogeic earthworms on soil erosion. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 104, 303-315.
- Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y., Jiang, S., 2003. Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology* 36, 272-276.
- Cheneby, D., Philippot, L., Hartmann, A., Henault, C., Germon, J.-C., 2000. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology* 34, 121-128.
- Chirnside, A. E. M., Ritter, W. F., Radosevich, M., 2007. Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 3056-3065.
- Colwell, R. K., Mao, C. X., Chang, J., 2004. Interpolating, Extrapolating, and Comparing Incidence-Based Species Accumulation Curves. *Ecology* 85, 2717-2727.
- de Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P., 1998a. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology* 180, 1951-1954.
- de Souza, M. L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D. E., Hay, A., Sadowsky, M. J., Wackett, L. P., 1998b. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 178-184.

- Decaëns, T., Rangel, A. F., Asakawa, N., Thomas, R. J., 1999. Carbon and nitrogen dynamics in ageing earthworm casts in grasslands of the eastern plains of Colombia. *Biology and Fertility of Soils* 30, 20-28.
- Devliegher, W., Verstraete, W., 1997. Microorganisms and soil physico-chemical conditions in the drilosphere of *Lumbricus terrestris*. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 1721-1729.
- Drake, H. L., Horn, M. A., 2007. As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual Review of Microbiology* 61, 169-189.
- Egert, M., Marhan, S., Wagner, B., Scheu, S., Friedrich, M. W., 2004. Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiology Ecology* 48, 187-197.
- Ettema, C. H., Wardle, D. A., 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 177-183.
- Felske, A., Wolterink, A., Van Lis, R., Akkermans, A. D. L., 1998. Phylogeny of the Main Bacterial 16S rRNA Sequences in Drentse A Grassland Soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 871-879.
- Ferrari, B. C., Binnerup, S. J., Gillings, M., 2005. Microcolony Cultivation on a Soil Substrate Membrane System Selects for Previously Uncultured Soil Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8714-8720.
- Furlong, M. A., Singleton, D. R., Coleman, D. C., Whitman, W. B., 2002. Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1265-1279.
- Giardina, M. C., Giardi, M. T., Filacchioni, G., 1982. Atrazine metabolism by *Nocardia*: elucidation of initial pathway and synthesis of potential metabolites. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1439-1445.
- Gomila, M., Bowien, B., Falsen, E., Moore, E. R. B., Lalucat, J., 2007. Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2629-2635.
- Griffiths, B. S., Ritz, K., Wheatley, R., Kuan, H. L., Boag, B., Christensen, S., Ekelund, F., Sorensen, S. J., Muller, S., Bloem, J., 2001. An examination of the biodiversity-

- ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1713-1722.
- Jegou, D., Schrader, S., Diestel, H., Cluzeau, D., 2001. Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms. *Applied Soil Ecology* 17, 165-174.
- Kersante, A., Martin-Laurent, F., Soulas, G., Binet, F., 2006. Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 57, 192-205.
- Kolic, N. U., Hrsak, D., Begonja Kolar, A., Petric, I., Stipicevic, S., Soulas, G., Martin-Laurent, F., 2007. Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 60, 299-307.
- Le Bayon, R. C., Binet, F., 2006. Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 235-246.
- Lindquist, D., Murrill, D., Burran, W. P., Winans, G., Janda, J. M., Probert, W., 2003. Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-Like Isolates from Human Patients, with an Emended Description of the Species. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 192-196.
- López, L., Pozo, C., Rodelas, B., Calvo, C., Juárez, B., Martínez-Toledo, M. V., González-López, J., 2005. Identification of Bacteria Isolated from an Oligotrophic Lake with Pesticide Removal Capacities. *Ecotoxicology* 14, 299-312.
- Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., Allan, D. L., 1993. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1695-1701.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., Wackett, L. P., 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1451-1457.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L. P., Wing, R., Sadowsky, M. J., 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology* 183, 5684-5697.
- Meharg, A. A., 1996. Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.). *Soil Biology and Biochemistry* 28, 555-559.

- Meysman, F. J. R., Middelburg, J. J., Heip, C. H. R., 2006. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology and Evolution* 21, 688-695.
- Monard, C., Lima, O., Martin-Laurent, F., Binet, F., Vandenkoornhuyse, P., submitted. Optimization of RNA extraction from small soil samples to quantify gene expression.
- Monard, C., Martin-Laurent, F., Vecchiato, C., Francez, A.-J., Vandenkoornhuyse, P., Binet, F., 2008. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* In press.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M. T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655-670.
- Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Van Baalen, C., Gibson, D. T., 1992. Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1351-1359.
- Orphan, V. J., Taylor, L. T., Hafenbradl, D., Delong, E. F., 2000. Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 700-711.
- Parkin, T. B., Berry, E. C., 1999. Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1765-1771.
- Pimentel, D., 1996. Green revolution agriculture and chemical hazards. *Science of The Total Environment* 188, S86-S98.
- Pivetz, B. E., Steenhuis, T. S., 1995. Soil matrix and macropore biodegradation of 2,4-D. *Journal of environmental quality* 24, 564-570.
- Radajewski, S., McDonald, I. R., Murrell, J. C., 2003. Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 296-302.
- Radosevich, M., Traina, S. J., Tuovinen, O. H., 1996. Biodegradation of atrazine in surface soils and subsurface sediments collected from an agricultural research farm. *Biodegradation* 7, 137-149.
- Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y. L., Tuovinen, O. H., 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 297-302.
- Rossello-Mora, R., Amann, R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 39-67.

- Rousseaux, S., Hartmann, A., Soulas, G., 2001. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 211-222.
- Schonholzer, F., Hahn, D., Zarda, B., Zeyer, J., 2002. Automated image analysis and *in situ* hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. *Journal of Microbiological Methods* 48, 53-68.
- Schwartz, M. W., Bringham, C. A., Hoeksema, J. D., Lyons, K. G., Mills, M. H., van Mantgem, P. J., 2000. Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia* 122, 297-305.
- Shapir, N., Mongodin, E. F., Sadowsky, M. J., Daugherty, S. C., Nelson, K. E., Wackett, L. P., 2007. Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *Journal of Bacteriology* 189, 674-682.
- Sigua, G. C., Isensee, A. R., Sadeghi, A. M., Im, G. J., 1995. Distribution and transport of atrazine as influenced by surface cultivation, earthworm population and rainfall pattern. *Chemosphere* 31, 4237-4242.
- Smith, D., Crowley, D. E., 2006. Contribution of ethylamine degrading bacteria to atrazine degradation in soils. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 271-277.
- Smith, D., Alvey, S., Crowley, D. E., 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology* 53, 265-275.
- Stamper, D., M., Radosevich, M., Hallberg, K., B., Traina, s. J., H., T. O., 2002. *Ralstonia basilensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 1089.
- Stenstrom, J., Svensson, K., Johansson, M., 2001. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 93-104.
- Stringfellow, W. T., Aitken, M. D., 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 357-362.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* 25, 4876-4882.

- Tiunov, A. V., Scheu, S., 1999. Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). Soil Biology and Biochemistry 31, 2039-2048.
- Tiunov, A. V., Dobrovolskaya, T. G., 2002. Fungal and bacterial communities in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. Pedobiologia 46, 595-605.
- Tiunov, A. V., Bonkowski, M., Bonkowski, M., Tiunov, J. A., Scheu, S., 2001. Microflora, Protozoa and Nematoda in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. Pedobiologia 45, 46-60.
- Top, E. M., Springael, D., 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. Current Opinion in Biotechnology 14, 262-269.
- Topp, E., Mulbry, W. M., Zhu, H., Nour, S. M., Cuppels, D., 2000a. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. Applied and Environmental Microbiology 66, 3134-3141.
- Topp, E., Zhu, H., Nour, S. M., Houot, S., Lewis, M., Cuppels, D., 2000b. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. Applied and Environmental Microbiology 66, 2773-2782.
- Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F. L., 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 782-787.
- Torsvik, V., Ovreas, L., Thingstad, T. F., 2002. Prokaryotic Diversity--Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. Science 296, 1064-1066.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R.-A., Oslash, vreas, L., 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology 64, 53-62.
- Urlacher, V. B., Lutz-Wahl, S., Schmid, R. D., 2004. Microbial P450 enzymes in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology V64, 317-325.
- Vaishampayan, P. A., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K., 2007. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. International Biodeterioration & Biodegradation 60, 273-278.
- Vandenkoornhuyse, P., Mahe, S., Ineson, P., Staddon, P., Ostle, N., Cliquet, J.-B., Francez, A.-J., Fitter, A. H., Young, J. P. W., 2007. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 16970-16975.

- Wardle, D. A., 2006. The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecology Letters* 9, 870-886.
- Wellington, E. M. H., Berry, A., Krsek, M., 2003. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Current Opinion in Microbiology* 6, 295-301.

4. Synthèse du chapitre IV

L'utilisation du SIP à partir d'ARN permet d'accéder directement aux bactéries réellement impliquées dans la dégradation d'un substrat (^{13}C -ARN) tout en ayant accès aux bactéries actives totales (^{12}C -ARN) dans le système étudié (Radajewski et al., 2003; Wellington et al., 2003; Dumont and Murrell, 2005; Neufeld et al., 2006). Cette technique permet de répondre avec précision à la question 'qui fait quoi ?' et de vérifier ou infirmer l'hypothèse que la diversité assure la fonction, question fondamentale en écologie microbienne pour la compréhension des processus microbiens intervenant dans un écosystème.

A la lumière de cette étude, nous montrons deux facteurs de structuration des communautés bactériennes actives du sol. Ainsi, l'addition d'un substrat carboné sélectionne et structure les bactéries actives du sol. De plus, au sein de microhabitats particuliers dans lesquels l'activité de certaines bactéries du sol est stimulée ('hot-spots'), tel que dans les turricules de vers, l'addition d'un substrat carboné facilement métabolisable comme l'acétate active et stimule le développement de certaines bactéries peu représentées initialement. Ces opportunistes écologiques (Stenstrom et al., 2001) sont devenus plus compétitifs et plus abondants en présence d'acétate et l'utilisation du SIP à partir d'ARN nous a permis d'accéder directement à ces communautés bactériennes. Néanmoins, comme l'ont observé Kuzyakov et Bol (2006), la réactivité de ces bactéries dépend de la nature du substrat puisque dans les turricules la consommation d'un substrat carboné complexe comme l'atrazine n'est pas stimulée par rapport au sol non bioturbé. Suite à l'addition de ^{13}C -atrazine une modification des communautés bactériennes actives dans le sol a également été observée dans les parois de galeries, avec une sélection de phylotypes bactériens inactifs ou faiblement représentés avant l'addition du substrat. Ainsi, après 8 jours d'incubation des phylotypes supplémentaires à ceux présents après deux jours ont été identifiés. Certains de ces nouveaux phylotypes ont été détectés dans la fraction lourde (^{13}C -ARN) (dont *Streptococcus oralis*, *Micrococcus luteus*, *Paracoccus marcusii*, *Methylobacterium lusitanum*, *Ralstonia basilensis* M91-3), et correspondent donc à des bactéries qui utilisent les carbones des chaînes de l'atrazine comme source nutritive. D'autres nouveaux phylotypes ont été détectés dans la fraction légère (^{12}C -ARN) (dont *Nocardioides fulvus* et *Acidovorax delafieldii*) correspondant soit à des bactéries utilisant les carbones non marqués de l'atrazine (carbones du cycle), soit utilisant l'atrazine comme source d'azote.

La bioturbation du sol par la macrofaune est un autre facteur de structuration des communautés bactériennes vérifié à deux reprises (articles 4 et 5). Chaque microsite de sol possède sa propre population bactérienne et sa propre diversité. Ainsi, après 8 jours d'incubation, 23 phylotypes différents ont été détectés dans les fractions légères (^{12}C -ARN) du sol non bioturbé, 19 dans les parois de galeries et 10 dans les turricules. La bioturbation a donc un effet globalement négatif sur la diversité des communautés bactériennes en réduisant le nombre de phylotypes bactériens différents (richesse spécifique), et particulièrement après digestion du sol par les lombriciens, certains phylotypes ne sont plus présents dans les microsites de sols générés par les vers de terre (*i.e.* *Nocardioides* sp. C190 et *Rhodococcus luteus*). Ces résultats confirment ceux de Haynes et al. (2003) qui avaient observés une diminution de la biomasse microbienne dans les turricules de deux espèces de lombriciens différentes, *L. rubellus* et *Aporrectodea caliginosa*. Néanmoins, la bioturbation du sol par les lombriciens permet le maintien de la diversité puisque certaines bactéries sont spécifiques aux parois de galeries (*N. fulvus*, *Shingomonas rhizogenes*, *A. delafieldii*, *Pseudomonas* sp. ADP et *Shigella sonnei*) et d'autres aux turricules (*Curvibacter gracilis*).

Par l'utilisation de la stratégie de SIP-ARN en présence de ^{13}C -atrazine, notre objectif était d'identifier les bactéries indigènes du sol capables de dégrader cette molécule et de comparer ces données aux connaissances disponibles dans la littérature concernant les bactéries et/ou consortia isolés. Pour cela différentes bactéries connues pour dégrader l'atrazine (*Nocardioides* sp. C190 (Topp et al., 2000a), *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai et al., 2003), *Aminobacter ciceroni* (Topp et al., 2000b), *Chelatobacter heintzii* (Rousseaux et al., 2001), *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum et al., 1995), *R. basilensis* M91-3 (Radosevich et al., 1995)) ont été incorporées dans chaque phylogénie réalisée. Alors qu'au total, 30 phylotypes dégradants ont été identifiés dans les trois microsites, seuls deux d'entre eux ont une forte homologie avec des isolats dégradant l'atrazine : *Pseudomonas* sp. ADP et *R. basilensis* M91-3 (Mandelbaum et al., 1995; Radosevich et al., 1995). Ainsi de nombreuses bactéries auparavant inconnues comme intervenant dans la dégradation de l'atrazine ont été identifiées. Certains de ces phylotypes n'ont été détectés que dans le ^{13}C -ARN (*Lactobacillus iners*, *Aeromicrobium ginsengisoli*, *M. luteus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter vibrioides*, *P. marcusii*, *Massilia timonae*, *R. basilensis* M91-3, *Pseudomonas aeruginosa*) indiquant que leur activité est étroitement dépendante de la présence atrazine. La présence de phylotypes proches de *P. aquatica* et de *M. timonae* AY157761, bactéries connues pour dégrader le phénanthrène, dans les fractions lourdes (^{13}C -ARN) de tous, ou presque, les

microsites laisse supposer que les monooxygénases impliquées dans la dégradation de l'atrazine et dans celle du phénanthrène sont proches d'un point de vue évolutif. Néanmoins des travaux complémentaires sont nécessaires pour valider cette idée car aucune similarité dans la dégradation de ces deux molécules n'a été observée jusqu'à présent (Fang et al., 2001).

Les bactéries dégradant l'atrazine ont sûrement acquis les gènes de dégradation par transfert horizontal puisqu'aucun lien phylogénétique n'existe entre elles et que ces gènes sont connus pour être mobiles grâce à des éléments de transposition (Eaton and Karns, 1991a; Martinez et al., 2001; Devers et al., 2005). De plus, jusqu'à maintenant, les seules bactéries isolées ayant intégré des gènes de dégradation de l'atrazine dans leur chromosome appartiennent au genre *Arthrobacter* (Cai et al., 2003; Vaishampayan et al., 2007) dont aucune séquence relative à ce genre n'a été mise en évidence dans nos expérimentations. D'après Daane et al. (1996) nous pouvons supposer que les taux de ces transferts horizontaux n'ont pas été stimulés par l'activité de bioturbation car *Lumbricus terrestris* contrairement à d'autres lombriciens n'a pas été montré comme favorisant ce processus.

Chaque microsite issu de la bioturbation du sol par les lombriciens possédant sa propre population bactérienne active, les bactéries réactives à l'addition d'un substrat seront donc différentes. Ainsi, les parois de galeries constituent un 'hot-spot' pour la dégradation de l'atrazine puisque la dégradation y est la plus rapide et les premiers dégradants (phylotype proche de *Pelomonas aquatica*) y sont détectés dès deux jours d'incubation. Cette spécificité des parois de galerie doit être liée à leurs propriétés physico-chimiques qui en font un habitat privilégié pour les microorganismes du sol (Binet and Trehen, 1992; Parkin and Berry, 1999; Tiunov and Scheu, 1999; Jegou et al., 2001; Amador et al., 2006; Le Bayon and Binet, 2006). Notamment, leur enrichissement en azote qui fournit aux bactéries cette source nutritive et leur permet d'utiliser l'atrazine comme source de carbone en parallèle, consommation sur laquelle est basée l'identification des bactéries dégradantes grâce au SIP-ARN.

La comparaison entre la diversité bactérienne dégradante dans les différents microsites et les cinétiques de dégradation obtenues nous montre qu'il n'y a pas de lien direct entre la diversité totale des bactéries actives ou même la diversité des bactéries dégradant l'atrazine et la fonction de dégradation : la diversité ne supporte pas la fonction. L'intensité de la réponse fonctionnelle semble surtout être portée par la présence d'espèces clés devant interagir au sein de consortia pour le déroulement du processus. Ainsi la présence du

phylotype proche de *P. aquatica* pourrait être importante mais pas suffisante puisque bien qu'intervenant dans la dégradation de l'atrazine dans les turricules, la dégradation de l'atrazine n'y est pas aussi importante que celle observée dans les parois de galeries. Par ailleurs, une autre dimension importante qui doit être prise en compte dans l'expression fonctionnelle est les interactions de type compétition, comme la lutte pour l'utilisation du substrat et l'occupation d'un habitat. Les bactéries les mieux adaptées aux contraintes du milieu et celles présentant la meilleure valeur sélective (fitness) dans l'habitat se maintiendront. De fait, il ne s'agira pas nécessairement des bactéries les plus efficaces dans la biodégradation du polluant qui subsistent dans l'habitat mais celles qui présentent la meilleure valeur sélective.

En parallèle des extractions d'ARN réalisées au cours des cinétiques de dégradation de l'atrazine marquée au ^{13}C , les quantités d'atrazine et de ses métabolites (hydroxyatrazine, DEA et DIA) ont été déterminées. Ainsi, le DIA n'a jamais été détecté, l'hydroxyatrazine a été quantifiée à chaque prélèvement mais en quantités très faibles (à la limite du seuil de détection) par rapport à la disparition d'atrazine et le DEA a été retrouvé de manière sporadique et également en quantités très faibles. Ces faibles détections des métabolites supposent que la dégradation de l'atrazine est intracellulaire comme proposé par Barriuso et al. (Barriuso and Houot, 1996), évoqué par la présence de gènes codant pour des protéines de transport de type ABC dans le plasmide pADP-1 retrouvé chez *Pseudomonas* sp. ADP (Martinez et al., 2001) et confirmé par Vaishampayan et al. (2007). De plus les cytochromes P450 à l'origine de la formation de DEA et de DIA sont également intracellulaires (Urlacher et al., 2004).

L'utilisation du SIP-ARN constitue donc un outil efficace pour une meilleure compréhension des processus de dégradation et des acteurs impliqués. Cette étude nous montre que cette technique peut être appliquée à des substrats et des milieux complexes. Couplé à des techniques moléculaires telles que la T-RFLP ou le séquençage, le SIP-ARN donne accès à des connaissances précieuses sur les communautés bactériennes réellement impliquées dans les fonctions supportées par le sol et leur activité et permet d'appréhender l'hétérogénéité spatiale des processus de dégradation et de leurs acteurs.

CHAPITRE V

Conclusions et perspectives

Ce travail de recherche fait écho aux problèmes de contamination organique des sols par les herbicides dont l'utilisation fréquente et généralisée en agriculture mais aussi par les collectivités a conduit à des pollutions diffuses dans tous les compartiments des écosystèmes terrestres et aquatiques. La rareté des informations disponibles à ce jour sur l'étendue spatiale et temporelle de ces pollutions en font un problème d'environnement majeur. Ancré aussi dans la réflexion générale sur le développement et l'agriculture durable, ce travail de recherche a eu pour objectif général de redéfinir la place et le rôle de la biodiversité dans les services écosystémiques rendus par les sols dont celui de dégradation des polluants, qui est à la base du potentiel épurateur des sols et au-delà de la résistance et résilience des écosystèmes.

Ainsi, l'ensemble de ce travail de thèse a été axé autour de la fonction de dégradation des herbicides et s'est particulièrement intéressé aux interactions biotiques existant entre la macrofaune lombricienne et les bactéries du sol, susceptibles de réguler les processus à l'origine du service de détoxification fourni par les bactéries du sol.

Dans le sol à l'échelle micrométrique, la dissémination des bactéries est un paramètre clé pour la dégradation des polluants. Elle augmente les probabilités de rencontre entre les bactéries et la molécule à dégrader et ces relations spatiales sont essentielles quant à la dissipation et le devenir du polluant dans le sol. La bioturbation du sol consiste en sa réorganisation physique et en la création de nouveaux micro-habitats et structures qui vont contrôler l'activité, l'abondance et la structure des communautés bactériennes du sol. Par conséquent les interactions existant entre les organismes ingénieurs du sol tels que les lombriciens et les communautés bactériennes dégradant les polluants sont d'un intérêt majeur pour la compréhension des mécanismes de détoxification et de dissipation des xénobiotiques.

Nous avons voulu savoir dans quelle mesure la bioturbation du sol par les lombriciens modifie les communautés bactériennes indigènes et celles dégradant l'atrazine et pour cela, nous avons pris en compte l'hétérogénéité spatiale générée par cette réorganisation physique du sol. De plus un niveau de complexité supérieur a été obtenu en utilisant deux sols aux propriétés physicochimiques différentes et avec des capacités de minéralisation de l'atrazine opposées. Nous nous sommes ainsi intéressés aux microsites issus de la bioturbation de ces deux sols par les vers (parois de galeries, endentères, turricules) en les considérant comme des habitats microbiens proximaux mais spatialement indépendants. A cette échelle, il s'est agi d'argumenter les questions suivantes en les reliant à l'activité de minéralisation ou de dégradation de l'atrazine *in situ* :

i) Dans quelle mesure la bioturbation du sol affecte-t-elle la structure et la taille des communautés bactériennes indigènes du sol et de celles dégradant l'atrazine ? Les bactéries dégradant l'atrazine sont-elles en plus grande concentration dans certains microsites de sol générés par la bioturbation et inversement ?

ii) Outre la dissémination des bactéries du sol, la bioturbation joue-t-elle un rôle dans leur activité et dans l'expression des gènes cataboliques ? Certains gènes d'intérêt pour la dégradation de l'atrazine dans le sol s'expriment-ils différemment dans les microsites de sol générés par la bioturbation et en quoi leur expression est affectée (répression, activation..) ?

iii) La bioturbation modifie-t-elle la diversité des communautés bactériennes indigènes et actives dans le sol et celles des communautés bactériennes activement impliquées dans la dégradation de l'atrazine ? Les consortia bactériens intervenant dans la dégradation sont-ils semblables ou différent-ils entre microsites de sol issus de la bioturbation ? La dégradation de l'atrazine s'en trouve-t-elle modifiée ?

La réponse à ces questions passe par une ouverture vers la génomique environnementale impliquant l'utilisation d'outils moléculaires dans l'objectif de résoudre des questions écologiques. Cette approche permet de s'affranchir de la mise en culture des bactéries étudiées et donc d'accéder à l'ensemble de la diversité bactérienne présente dans le sol. Pour cela un développement méthodologique important ciblant l'étude de l'ARN a été entrepris par la mise en place des techniques de RT-qPCR et de SIP-ARN. Nous nous sommes ainsi intéressés aux bactéries actives du sol et donc celles directement à l'origine des fonctions supportées par le sol. Grâce à ces approches, nos résultats confirment et avancent de nouvelles notions concernant les interactions biotiques macrofaune lombricienne/bactéries du sol et leur impact sur la diversité bactérienne et sur l'hétérogénéité du sol.

1. Les avancées fondamentales acquises

Une première action mesurable de la bioturbation est la modification de la structure des communautés bactériennes dans les deux sols (T-RFLP, RISA), confirmant les observations préalables de Kersanté et al. (2003). L'identification des bactéries actives dans chaque microsite de sol par séquençage nous a permis de préciser cette modification de la composition des communautés bactériennes générée par les vers de terre. Ainsi chaque

microsite de sol ne renferme pas les mêmes groupes phylogénétiques dominants (*Actinobactéries*, *Firmicutes* et β -*Protéobactéries* dans le sol non bioturbé, α -, β - et γ -*Protéobactéries* dans les parois de galeries et *Actinobactéries* et β -*Protéobactéries* dans les turricules) indiquant une sélection et/ou déplétion de certains groupes bactériens. Ces modifications de la diversité des communautés bactériennes sont dues i) aux propriétés physico-chimiques caractéristiques des microsites (humidité, pH, matière organique, C, N, P...) qui constituent des micro-habitats favorables au développement de certaines bactéries (e.g. Furlong et al., 2002) et ii) au passage du sol dans le système digestif des lombriciens qui peut soit stimuler l'activité de certaines bactéries du sol comme celles sous forme de spores (Fischer et al., 1997), soit diminuer l'abondance de bactéries utilisées comme source nutritive ou ne résistant pas à l'action des enzymes digestives (Bohlen and Edwards, 1995; Khomyakov et al., 2007).

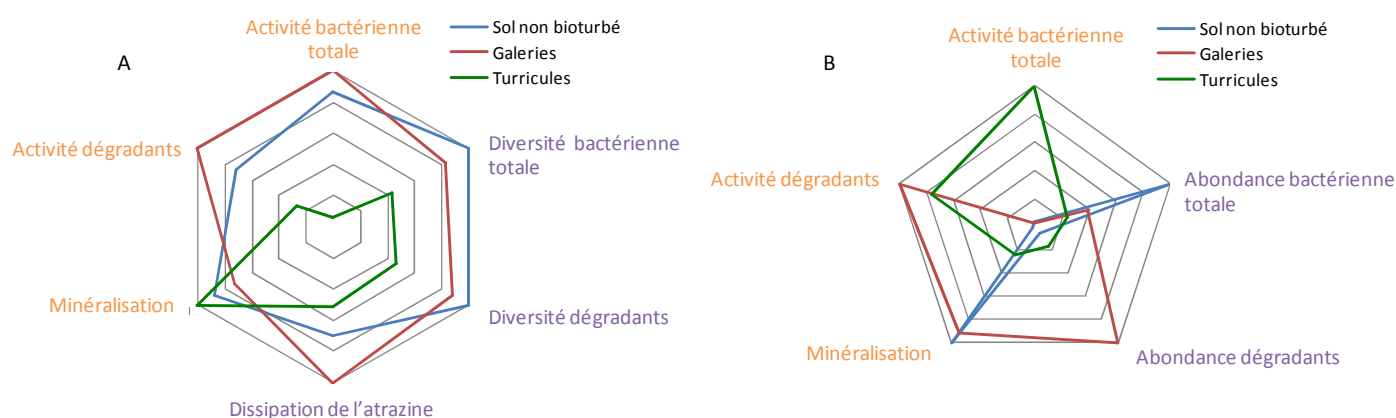


Figure V-1 : Un exemple de synthèse de l'ensemble des résultats obtenus durant le travail de thèse dans les microsites issus des sols d'Epoisses (A) et de Vezin (B). L'activité bactérienne totale correspond au nombre de gènes codant pour l'ARNr 16S exprimés 7 jours après l'addition de 1.5 mg d'atrazine par kg de sol sec, l'activité des dégradants au nombre de gènes *atzD* exprimés 7 jours après l'addition de 1.5 mg d'atrazine par kg de sol sec, la diversité bactérienne totale au nombre de phylotypes total détectés 8 jours après l'addition de 25 mg de ^{13}C -atrazine par g de sol sec, la diversité des dégradants au nombre de phylotypes détectés dans les fractions lourdes (^{13}C -ARN) 8 jours après l'addition de 25 mg de ^{13}C -atrazine par g de sol sec, la dissipation de l'atrazine à la quantité d'atrazine retrouvée 8 jours après l'addition de 25 mg de ^{13}C -atrazine par g de sol sec, la minéralisation au taux de minéralisation de ^{14}C -atrazine dans les 3 jours suivant son apport à une concentration de 1.5 mg par g de sol sec, l'abondance bactérienne totale au nombre de gènes codant l'ARNr 16S détecté juste après le démontage des microcosmes, l'abondance dégradants au nombre de gène *atzA* détecté juste après le démontage des microcosmes. Chaque couleur (orange et violet) correspond aux résultats d'une même expérimentation.

Une synthèse des résultats obtenus durant ce travail de recherche est présentée dans la figure V-I. La comparaison des différentes expérimentations est à prendre avec précaution puisque les quantités d'atrazine apportées sont parfois différentes et les sols utilisés ont été

prélevés à au moins une année d'intervalle. Néanmoins différentes conclusions se dégagent de ces expérimentations.

1.1. Une survie différente des bactéries du sol à l'ingestion par les lombriciens

Le passage du sol dans le tractus digestif du ver modifie significativement les communautés bactériennes du sol. En effet, comme proposé par Fischer et al (1997) et Drake et Horn (2007), dans le sol de Vezin, les bactéries présentes sous forme d'endospores (bactéries Gram +) seraient activées au cours du passage dans les endentères et pourraient être à l'origine des quantités d'ARNr 16S plus importantes retrouvées dans les turricules (figure V-I). A l'opposé, comme Pedersen et Hendriksen (1993) qui ont montré par culture une diminution du nombre total de CFU et du nombre d'*E. coli* et de *P. putida* dans les turricules de *Lumbricus* spp., il semblerait qu'une partie des bactéries du sol soit utilisée comme source nutritive et digérée, diminuant ainsi la taille des communautés bactériennes (gène codant l'ARNr 16S) retrouvées dans les turricules (figure V-I). Cet effet contrasté de la digestion du sol par le ver sur les bactéries semble être directement lié à l'action du fluide digestif et son contenu enzymatique (Curry and Schmidt, 2007; Khomyakov et al., 2007).

Dans les turricules du sol d'Epoisses, excepté une minéralisation de l'atrazine plus importante que dans les autres microsites, tous les autres critères mesurés sont les plus faibles (figure V-I). Néanmoins, nous avons montré que les bactéries présentes dans les turricules sont plus réactives à l'addition d'un substrat carboné simple que celles présentes dans le sol non bioturbé. L'identification des bactéries actives dans ce microsite montre que les *Firmicutes*, classe bactérienne comprenant la majorité des bactéries sporulantes, disparaissent suite à la digestion du sol par le ver. Par contre deux phylotypes bactériens hautement similaires à *Micrococcus luteus* (Actinobactérie) et *Massilia timonae* (β -Protéobactérie), bactéries non sporulantes, présents en faible quantité dans le sol non bioturbé, sont 'sélectionnés' dans les turricules. Ces résultats ne corroborent pas l'hypothèse d'activation des spores bactériens durant la digestion du sol par les lombriciens (Fischer et al., 1997; Drake and Horn, 2007) dans le sol d'Epoisses mais sous-entendent néanmoins une digestion sélective des bactéries du sol par le ver.

Ainsi, grâce à des techniques de biologie moléculaire, nous confirmons les résultats obtenus par mise en culture et par mesure de l'activité microbienne classique (respiration basale, quotient métabolique...)(Daniel and Anderson, 1992; Binet et al., 1998; Tiunov and

Scheu, 2000a; Haynes et al., 2003) : la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne et plus particulièrement le passage dans le tube digestif stimule l'activité des bactéries du sol qui survivent à l'ingestion, mais une réduction de la taille des communautés bactériennes est observée, indiquant une capacité de survie différente des bactéries du sol au fluide digestif des lombriciens (Khomyakov et al., 2007). Selon le type bactérien, la digestion du sol par les vers de terre aurait donc un effet opposé. Dans le cadre de la dégradation de l'atrazine, l'inoculation de bactéries Gram - (*Pseudomonas* sp. ADP et *C. heintzii*) nous a confirmé que ces bactéries ne résistaient pas à la digestion par le ver puisque aucune stimulation de la minéralisation n'a été observée dans les turricules, tout comme aucune expression du gène *atzA* qui n'est porté que par ce type bactérien (Ghosh et al., 2008).

1.2. Les parois de galeries : un microsite particulier pour les bactéries dégradant l'atrazine

Les parois de galeries issues des deux sols représentent un microsite spécial pour les bactéries dégradant l'atrazine. Ainsi dans le sol de Vezin les gènes *atzA* y sont sélectionnés en cohérence avec une concentration d'hydroxyatrazine plus importante dans ce microsite préalablement observée au champ par Kersanté (2003). Nous avons également montré que le gène *atzD* s'exprime en plus grande quantité dans ce microsite et la minéralisation y a été observée plus importante dans une des expérimentations (article 3, figure V-I). Les analyses réalisées dans le sol d'Epoisses confirment cette particularité des galeries puisque la consommation d'atrazine y est la plus rapide et les premières bactéries dégradantes y ont été identifiées (figure V-I). Il est intéressant d'observer que dans les parois de galeries issues de ce sol, la minéralisation de ^{14}C -cycle atrazine est la plus faible, la minéralisation de ^{14}C -éthyl atrazine est équivalente à celle des turricules mais supérieure à celle du sol non bioturbé et la disparition de l'atrazine est la plus rapide par rapport aux autres microsites (Tableau V-1). Il semblerait que les bactéries dégradant l'atrazine présentes dans les parois de galeries possèdent majoritairement les enzymes de dégradation intervenant sur les chaînes latérales carbonées et non celles dégradant le cycle. Cela est confirmé par une expression moins importante du gène *atzD* dans ce microsite issu du sol d'Epoisses.

Tableau V-1 : Importance relative de la minéralisation de l'atrazine et de sa disparition dans les turricules et les parois de galeries par rapport au sol non bioturbé.

		Turricules	Galeries
Minéralisation	¹⁴ C-Ethyl atrazine	+	+
	¹⁴ C-Cycle atrazine	+	-
Dissipation	Atrazine	=	+

1.3. Relation hétérogénéité - diversité bactérienne - fonction

Alors que la bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne est source d'hétérogénéité spatiale par la création de différents micro-habitats, nous avons voulu savoir si cette réorganisation du sol était source de diversité bactérienne et si la fonction de dégradation était modifiée en conséquence. En se plaçant à l'échelle du microsite de sol généré par la bioturbation, nous avons montré que cette hétérogénéité spatiale résultait dans une plus grande diversité des bactéries actives du sol. Ainsi, 11 et 5 nouveaux phylotypes bactériens non détectés dans le sol non bioturbé ont été identifiés dans les parois de galeries et les turricules respectivement. Certaines bactéries sont donc spécifiques aux microsites de sol générés par la bioturbation par le ver.

La technique de SIP-ARN qui relie la biodiversité à la fonction revêt un intérêt fondamental pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes à une échelle microscopique. Ainsi, nous avons mis en évidence des modifications majeures dans la diversité des bactéries dégradant l'atrazine suite à la bioturbation du sol. En revanche nous n'avons pas pu relier cette diversité à l'activité de dégradation de la molécule herbicide mesurée en parallèle. Ainsi, dans les turricules où seuls 8 phylotypes activement impliqués dans la dégradation de l'atrazine ont été détectés, la dissipation de l'atrazine est identique à celle mesurée dans le sol non bioturbé contenant 17 phylotypes bactériens dégradants. La fonction de dégradation de l'atrazine n'est donc pas clairement corrélée à la diversité des bactéries dégradantes dans le sol. La présence d'espèces clés semble être nécessaire à une dégradation rapide de la molécule. Ainsi le phylotype hautement similaire à *Pelomonas aquatica* participerait à cette dégradation accélérée mais sa seule présence n'est pas suffisante. D'autres bactéries appartenant au même consortium doivent également avoir un rôle clé dans le processus. L'ensemble de ces bactéries constituerait la 'richesse spécifique seuil' (Bengtsson, 1998) nécessaire au maintien de la dégradation rapide de l'atrazine dans le sol.

La bioturbation du sol par la macrofaune lombricienne génère des 'hot spot' où l'activité bactérienne est stimulée par rapport au sol non bioturbé (Bundt et al., 2001; Barrios, 2007). Nous montrons que cette stimulation de l'activité bactérienne affecte la dégradation de l'atrazine comme observé dans les parois de galeries où une dégradation accélérée de la molécule par rapport aux autres microsites de sol a été mesurée.

L'interdépendance existant entre l'hétérogénéité structurale générée par la bioturbation du sol, la diversité bactérienne et la fonction de dégradation de l'atrazine est donc complexe à l'échelle des microsites de sol.

1.4. L'adaptation des bactéries du sol : un déterminant initial majeur

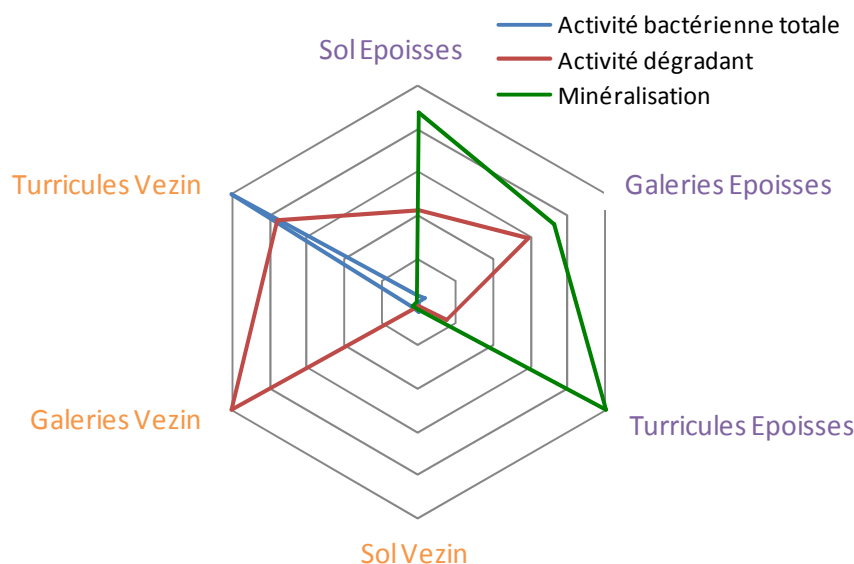


Figure V-2 : Un exemple de synthèse des résultats obtenus durant le travail de thèse dans les microsites des sols d'Epoisses et de Vezein (violet et orange). **L'activité bactérienne totale** correspond au nombre de gènes codant pour l'ARNr 16S exprimés 7 jours après l'addition de 1.5 mg d'atrazine par kg de sol sec, **l'activité des dégradants** au nombre de gènes *atzD* exprimés 7 jours après l'addition de 1.5 mg d'atrazine par kg de sol sec et **la minéralisation** au taux de minéralisation de ^{14}C -atrazine dans les 3 jours suivant son apport à une concentration de 1.5 mg par g de sol sec.

Alors qu'initialement le sol de Vezein présente une activité bactérienne totale, une activité bactérienne dégradante et un taux de minéralisation de l'atrazine très faibles, celles-ci sont stimulées dans les microsites issus de la bioturbation du sol par le ver (figure V-2). Néanmoins, l'impact des lombriciens sur la dégradation de l'atrazine dépend étroitement des propriétés physico-chimiques du sol d'origine et du pool bactérien présent (figure V-2). Nous avons pu voir que selon le sol la minéralisation de l'atrazine est soit stimulée soit inhibée dans

les turricules (figure V-2). Cela peut être lié à des processus de piégeage de l'atrazine (adsorption, rétention...) qui la rendent inaccessible à la dégradation bactérienne (Park et al., 2003; Alekseeva et al., 2006; Binet et al., 2006). Ces processus dépendent directement de la physico-chimie du sol. La composante microbienne initiale du sol est également primordiale puisque selon les groupes bactériens présents dans le sol ingéré, la digestion par le ver stimule ou inhibe les communautés bactériennes. Ces différences liées au sol de départ sont également observées dans les parois de galeries : dans le sol de Vezin la minéralisation y est stimulée ce qui n'est pas le cas dans le sol d'Epoisses. Ainsi, même si le choix de ces deux sols n'était basé que sur leur capacité à minéraliser l'atrazine, d'autres critères (pH, pourcentage de matière organique, granulométrie...) seraient à prendre en considération pour une meilleure compréhension des interactions bactéries/lombriciens. Néanmoins, d'un point de vue purement biotique, nous montrons que l'adaptation des communautés bactériennes d'un sol à la dégradation d'un polluant se traduit par une expression plus importante des gènes de dégradation impliqués relativement à l'activité totale des bactéries du sol.

1.5. Dégradation de l'atrazine et changement d'échelles

L'échelle du microsite de sol a été privilégiée dans ce travail de thèse pour rendre compte des interactions biotiques bactéries/lombriciens médiées par la bioturbation du sol. Il est fort probable que les vers de terre régulent la dégradation de l'atrazine et sûrement celle d'autres molécules polluantes à l'échelle de la parcelle. *Lumbricus terrestris* est l'une des espèces les plus représentées dans nos sols agricoles tempérés (Le Bayon et al., 2002), elle participe grandement à l'hétérogénéité structurale des sols de par sa forte capacité fouisseuse à l'origine de larges et importants déplacements des composants abiotiques et biotiques du sol (minéraux, organiques et cellules microbiennes) ainsi que du mélange intime de ces mêmes constituants lors de l'ingestion et digestion du sol. Ainsi le réseau de galeries peut représenter une surface de 4.9 m² par m² de sol (Kretzschmar, 1982) et la production de turricules en sol cultivé tempéré a été évaluée entre 2.5 et 3.5 kg (poids sec) par m² et par an pour 100 g de vers par m² (Binet and Le Bayon, 1999). L'impact de *Lumbricus terrestris* sur les communautés bactériennes du sol ne peut donc être négligé. Dans des objectifs de bioremédiation de sols pollués il est donc important de considérer l'ensemble de l'hétérogénéité du sol générée par les différents organismes y vivant, qu'il s'agisse de la drilosphère ou encore de la rhizosphère. Il est également important de prendre en compte la

biodisponibilité de l'atrazine dépendant des phénomènes d'adsorption sur les constituants du sol (matière organique, argile, acides humiques...). Cette adsorption est fonction du temps et conduit à la formation de résidus liés, diminuant ainsi la disponibilité de l'atrazine à la dégradation (Gevao et al., 2000). De plus, il a été montré que l'ingestion du sol par les lombriciens favorise cette adsorption de l'atrazine et double la formation de résidus liés dans les turricules (Binet et al., 2006). A l'échelle des microsites de sol à laquelle nous avons travaillé, la disponibilité de l'atrazine est optimisée, nos résultats sont donc transférables à des situations similaires à la parcelle.

L'échelle temporelle est également à prendre en compte. Ainsi, à l'échelle de quelques jours nous avons pu voir que la diversité des bactéries actives dans les galeries du sol d'Epoisses évoluait (article 5), cela doit être le cas dans tous les microsites. De plus, l'adaptation des bactéries du sol à la dégradation de l'atrazine nécessite un certain temps et le prétraitement des sols deux semaines avant chaque expérimentation nous a permis de préparer le pool génétique dégradant afin d'optimiser la biodégradation de l'atrazine. A une échelle annuelle nous avons également observé des différences de cinétique de dégradation de l'atrazine entre deux sols prélevés sur la même parcelle à un ou deux ans d'intervalle ce qui suppose une évolution des bactéries présentes initialement. Certaines contradictions sont ainsi observables puisque par exemple dans les turricules du sol d'Epoisses, une première expérimentation (article 3) montrait une minéralisation importante de l'atrazine alors qu'une seconde expérimentation (article 5) montrait la dissipation de l'atrazine la plus faible dans ce microsite.

L'ensemble des travaux présentés dans cette étude nous a donc permis d'appréhender les hétérogénéités spatiale et temporelle associées à cette matrice complexe qu'est le sol et leur influences sur la fonction de biodégradation qu'il supporte.

1.6. Avancées sur les voies de dégradations de l'atrazine

A partir de l'ensemble des résultats présentés dans ce manuscrit de thèse et des connaissances disponibles sur la dégradation de l'atrazine, nous pouvons proposer les voies de dégradation et les gènes impliqués dans les deux sols étudiés. Ainsi, bien qu'étant présent, l'expression du gène *atzA* n'a pas été détectée mais la présence d'hydroxyatrazine a été observée dans tous les microsites issus du sol d'Epoisses. L'étape de déchloration doit donc intervenir. La détection de DEA démontre que la *N*-Déalkylation de l'atrazine doit également

être réalisée et l'expression du gène *atzD* démontre la formation d'acide cyanurique qui nécessite la déchloration du DEA préalablement formé. Les voies de dégradation potentiellement impliquées sont présentées dans la figure V-3. Dans les parois de galeries où une dissipation plus rapide de l'atrazine a été observée, nous pouvons supposer que la voie dite rapide passant par la déchloration de l'atrazine et impliquant le gène *atzA* est préférentielle par rapport à la dégradation plus lente et non spécifique à l'atrazine associée à la *N*-déalkylation (Seffernick and Wackett, 2001; Martin-Laurent et al., 2004)

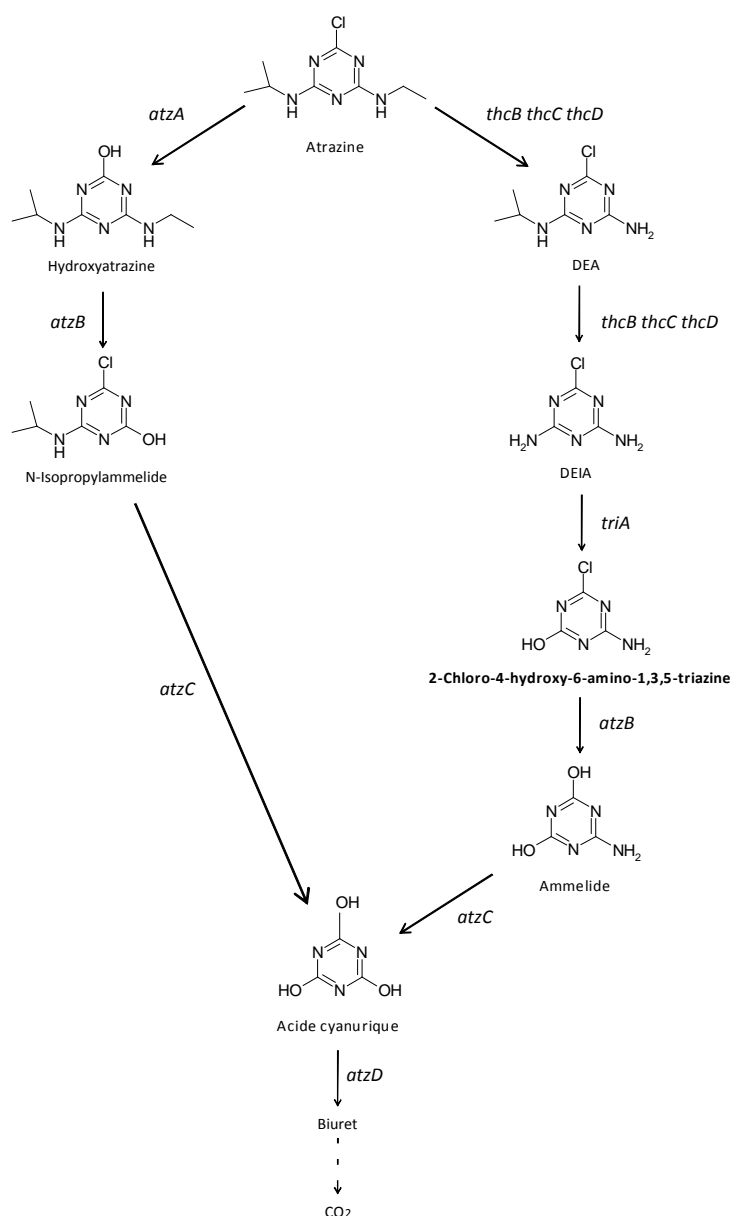


Figure V-3 : Voies de dégradation potentiellement utilisées par les bactéries des sols d'Epoisses et de Vezin.

D'après ces résultats et contrairement à notre hypothèse de départ, le gène *atzA* ne serait pas un bon indicateur de la dégradation de l'atrazine *in situ*. L'étude d'autres gènes de dégradation connus (*atzB*, *atzC*, *trzA*) permettrait de mieux comprendre les processus impliqués dans la dégradation de l'atrazine dans le sol. La bactérie *Pseudomonas* sp. ADP capable de réaliser à elle seule la minéralisation totale de l'atrazine (Mandelbaum et al., 1995) n'est sûrement pas représentative de ce qu'il se passe dans le sol. En effet la dégradation de l'atrazine est vraisemblablement réalisée par des consortia bactériens, comme le laisse entendre les résultats que nous avons obtenus avec le SIP à partir d'ARN montrant que de nombreux phylotypes bactériens différents interviennent dans la dégradation. Cela est notamment justifié par le fait qu'aucune bactérie réalisant la *N*-Déalkylation et possédant les gènes *atz* n'a encore été isolée. Ces réactions seraient donc réalisées par des bactéries différentes. De plus, toutes les bactéries n'utilisent pas l'atrazine de la même façon puisque cette molécule peut leur servir soit de source de carbone, soit de source d'azote ou encore des deux. Ainsi, chaque bactérie doit posséder les gènes nécessaires à l'utilisation de l'atrazine sous la forme de substrat qui lui convient. Par exemple, en utilisant l'atrazine comme source de carbone, les bactéries ne consommeront que les chaînes carbonées et ne réaliseront pas le clivage du cycle alors qu'en utilisant l'atrazine comme source d'azote elles devront réaliser les réactions de déamination et l'ouverture du cycle. Comme le montre la figure V-3, plusieurs voies de dégradation doivent être réalisées simultanément et il est également très vraisemblable que des bactéries différentes réalisent les mêmes étapes de dégradation et cette redondance fonctionnelle doit être générée par les transferts horizontaux de gènes. Cette redondance fonctionnelle est particulièrement importante pour la résilience du sol et sa résistance à différentes perturbations (Swift et al., 2004; Hooper et al., 2005; Barrios, 2007). Ainsi, la disparition d'une espèce bactérienne ne sera pas préjudiciable au bon déroulement du processus de dégradation de l'atrazine puisqu'une autre espèce pourra intervenir à cette même étape de la voie de dégradation.

2. Perspectives de recherche

D'ores et déjà, différentes perspectives de recherche sont identifiées et rapidement réalisables pour développer les connaissances initiées durant ce travail. Tout d'abord, alors que nous ne nous sommes intéressés qu'à la dégradation bactérienne de l'atrazine, il serait intéressant d'étudier l'intervention d'autres microorganismes tels que les champignons qui

sont également connus pour dégrader cette molécule (e.g. Masaphy et al., 1996). Ainsi, à partir des échantillons d'ARN du SIP obtenus dans les fractions légères et lourdes du gradient d'ultracentrifugation, nous pourrions rechercher l'ARNr 18S de champignons.

En parallèle de ce travail, des isollements de bactéries cultivables à partir des sols d'Epoisses et de Vezin utilisant l'atrazine soit comme source d'azote soit comme source de carbone dans les différents microsites générés par les lombriciens ont été ou seront réalisés (pas présentés dans ce manuscrit). Les gènes de dégradation (*atz* et *trz*) présents dans les différents consortia isolés ont été recherchés et après séquençage des bactéries présentes nous pourrions comparer ces résultats à ceux obtenus avec le SIP (dans la limite de la cultivabilité des bactéries identifiées). Il nous sera alors possible de relier la bactérie dégradante au gène qu'elle porte ainsi que d'identifier les différents acteurs au sein d'un consortium. Ce rapprochement entre une technique culture-dépendante et le SIP-ARN constituerait également une validation de cette dernière en terme d'apports complémentaires à la connaissance des bactéries classiquement étudiées.

La technique de SIP peut être associée à la construction de banques bactériennes métagénomiques (Dumont et al., 2006). Cela est réalisable à partir des ADNs présents dans les fractions lourdes du gradient d'ultracentrifugation. Une telle expérimentation apporterait des informations précieuses sur l'agencement des gènes de dégradation, les processus de régulation et potentiellement la découverte de nouveaux gènes impliqués dans la dégradation de l'atrazine. Une telle banque de données couplées aux connaissances actuelles pourrait servir de base à la réalisation de puces à ADN pour la détection *in situ* de l'activité métabolique des bactéries dégradantes et des gènes impliqués.

Les travaux réalisés dans ce travail de thèse montrent la nécessité et l'importance de travailler sur l'ARN en écologie microbienne fonctionnelle. Ce support permet de cibler uniquement les bactéries actives du sol et donc celles potentiellement capable d'intervenir dans les fonctions supportées au sein d'un écosystème. Les études transcriptionnelles permettent donc de s'affranchir du bruit de fond que représente les bactéries dormantes dans le sol. Ainsi, la quantification de l'expression de gènes fonctionnels apporte des informations sur l'activité *in situ* des microorganismes impliqués dans le processus étudié. Bien qu'étant auparavant limitée par les techniques d'extractions d'ARN de sol disponibles, cette technique appliquée au sol a émergée très récemment (Leininger et al., 2006; Nicolaisen et al., 2008) et promet d'apporter de nouvelles connaissances concernant la relation entre activité et fonction

dans cet écosystème. Dans un contexte de biodégradation de molécules xénobiotiques, relier l'activité spécifique des bactéries du sol aux cinétiques de dégradation apporte des informations précieuses sur les processus de régulation et les gènes réellement impliqués dans la fonction.

Potentiellement puissant, le SIP-ARN présente quelques limites. La première est liée au marquage de la molécule. En effet le choix du marquage cible une partie de la communauté dégradante. Alors que ce problème ne se pose pas avec des substrats simples, dans le cas de l'atrazine nous y sommes confrontés. Nous avons choisi de ne marquer que les carbones des chaînes éthyles de la molécule ciblant ainsi les bactéries dégradantes utilisant uniquement ces carbones comme source nutritive. L'atrazine étant également une source d'azote, le seul marquage des carbones ne nous permet d'accéder aux bactéries utilisant cette source nutritive et pourtant dégradantes. La seconde limite du SIP-ARN observée est directement liée au fait de travailler sur l'ARN. En effet la recherche de gènes de dégradation de l'atrazine dans les différentes fractions du gradient d'ultracentrifugation est limitée par les faibles quantités d'ARNm exprimées et extraites du sol. Ainsi, dans l'objectif de développer l'utilisation de la technique de SIP-ARN, il serait intéressant de consolider sa maîtrise afin de valider ces apports et de restreindre les limites observées. Dans le cas de molécules xénobiotiques complexes, un avantage serait de diminuer les quantités de molécules marquées à apporter afin de limiter la structuration et la sélection des communautés bactériennes générées par l'addition d'un substrat potentiellement toxique. Nos résultats montrent que cela est envisageable puisque nous avons détecté du ^{13}C -ARN dans le gradient d'ultracentrifugation alors que moins de la moitié de ^{13}C -atrazine initialement apportée était dégradée. Dans l'idéal, cette technique utilisant des isotopes stable pourrait être appliquée au terrain afin d'étudier les fonctions de dégradation de polluants supportées *in situ* par le sol et d'identifier les acteurs intervenant dans la résilience de ce système.

Ce travail de recherche a permis l'acquisition de connaissances fondamentales et originales dans la compréhension des mécanismes biotiques régulant la dégradation des molécules organiques de type herbicide dans le sol. Il présente aussi un intérêt dans un objectif d'application dans un cadre de bioremédiation de sols pollués. L'inoculation de souches bactériennes dégradantes naturelles ou transformées (bioaugmentation) s'est déjà avérée efficace (Struthers et al., 1998; Newcombe and Crowley, 1999; Rousseaux et al., 2003) mais l'introduction de ces bactéries dans le sol nécessite la prise en compte des différentes

interactions auxquelles elles seront soumises *in situ*. Ainsi, notre étude donne un aperçu du devenir de souches inoculées soumises à la bioturbation du sol par les lombriciens. En considérant l'importance de cette macrofaune dans nos sols tempérés, il est nécessaire de ne pas sous estimer son action sur les bactéries présentes naturellement ou artificiellement dans le sol. Par exemple, en considérant l'impact de leur digestion sur les communautés bactériennes du sol, il serait préférable d'utiliser une bactérie Gram + comme agent de bioremédiation ou de les protéger dans des particules d'argile (Grundmann et al., 2007).

Comme observé par Rousseaux et al. (2003), nos résultats montrent que l'inoculation de bactéries dégradant l'atrazine dans un sol à forte capacité dégradante n'a aucun effet sur la minéralisation de l'atrazine. Ainsi, la bioremediation d'un sol par bioaugmentation doit prendre en compte les propriétés intrinsèques du sol. Dans le cas d'un sol déjà capable de dégrader rapidement l'atrazine peut être que la biostimulation des bactéries intervenant par ajout de sources de carbone ou d'azote extérieure suffirait à augmenter la dégradation (Silva et al., 2004).

Dans le cas de sols pollués, nous avons pu observer l'importance de la bactérie similaire à *Pelomonas aquatica* dans les parois de galeries après addition d'une forte concentration d'atrazine (25 mg par g de sol sec). L'identification du consortium dans lequel elle intervient pour la dégradation de l'atrazine pourrait générer de nouveaux 'outils' dans un objectif de bioremédiation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alekseeva, T., P. Besse, F. Binet, A. M. Delort, C. Forano, N. Josselin, M. Sancelme and C. Tixier, 2006** - Effect of earthworm activity (*Aporrectodea giardi*) on atrazine adsorption and biodegradation. *European Journal of Soil Science*. **57**, 295-307.
- Allaby, R. G. and M. Woodwark, 2004** - Phylogenetics in the Bioinformatics Culture of Understanding. *Comparative and functional genomics*. **5**, 128-146.
- Allen, E. E. and J. F. Banfield, 2005** - Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nature Reviews Microbiology*. **3**, 489-498.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman, 1997** - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. **25**, 3389-3402.
- Amador, J. A., J. H. Gorres and M. C. Savin, 2006** - Effects of *Lumbricus terrestris* L. on nitrogen dynamics beyond the burrow. *Applied Soil Ecology*. **33**, 61-66.
- Anderson, I. C. and J. W. G. Cairney, 2004** - Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. **6**, 769-779.
- Anderson, J. M., 1988** - Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. *Biology and Fertility of Soils*. **6**, 216-227.
- Arbeli, Z. and C. L. Fuentes, 2007** - Accelerated biodegradation of pesticides: An overview of the phenomenon, its basis and possible solutions; and a discussion on the tropical dimension. *Crop Protection*. **26**, 1733-1746.
- Assink, J. W. and W. J. Van den Brink, 1986** - Contaminated soil. In: J. W. Assink and W. J. Van den Brink (Eds.), 1st Int. TNO Conf. on contaminated soil, Martinus, Nijhoff, Dordrecht, Utrecht, The Netherlands.
- Barrios, E., 2007** - Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics*. **64**, 269-285.
- Barriuso, E. and S. Houot, 1996** - Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biology and Biochemistry*. **28**, 1341-1348.
- Beare, M., D. Coleman, D. Crossley, P. Hendrix and E. Odum, 1995** - A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. *Plant and Soil*. **170**, 5-22.
- Bedos, C., M.-F. Rousseau-Djabri, D. Flura, S. Masson, E. Barriuso and P. Cellier, 2002** - Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin. *Atmospheric Environment*. **36**, 5917-5925.
- Behki, R. M. and S. U. Khan, 1986** - Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **34**, 746-749.
- Bengtsson, J., 1998** - Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology*. **10**, 191-199.
- Binet, F. and P. Curmi, 1992** - Structural effects of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on the soil-organic matter system: Micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biology and Biochemistry*. **24**, 1519-1523.
- Binet, F. and P. Trehen, 1992** - Experimental microcosm study of the role of *Lumbricus terrestris* (oligochaeta: lumbricidae) on nitrogen dynamics in cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **24**, 1501-1506.
- Binet, F., 1993** - Dynamique des peuplements et fonctions des lombriciens en sols cultivés tempérés, Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, pp. 299.

Binet, F., V. Hallaire and P. Curmi, 1997 - Agricultural practices and the spatial distribution of earthworms in maize fields. Relationships between earthworm abundance, maize plants and soil compaction. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**, 577-583.

Binet, F., L. Fayolle, M. Pussard, J. J. Crawford, S. J. Traina and O. H. Tuovinen, 1998 - Significance of earthworms in stimulating soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*. **27**, 79-84.

Binet, F. and R. C. Le Bayon, 1999 - Space-time dynamics *in situ* of earthworm casts under temperate cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **31**, 85-93.

Binet, F., A. Kersante, C. Munier-Lamy, R.-C. Le Bayon, M.-J. Belguy and M. J. Shipitalo, 2006 - Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **38**, 1255-1263.

Blackwood, C. B. and E. A. Paul, 2003 - Eubacterial community structure and population size within the soil light fraction, rhizosphere, and heavy fraction of several agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry*. **35**, 1245-1255.

Blanchart, E., A. Albrecht, J. Alegre, A. duboisset, B. Pashanasi and P. Lavelle, 1999 - Effects of earthworms on soil structure and physical properties. In: P. Lavelle, L. Brussaard and P. Hendrix (Eds.), *Earthworm management in tropical agroecosystems*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 139-162.

Blanchart, E., A. Albrecht, G. Brown, T. Decaens, A. Duboisset, P. Lavelle, L. Mariani and E. Roose, 2004 - Effects of tropical endogeic earthworms on soil erosion. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. **104**, 303-315.

Bohlen, P. J. and C. A. Edwards, 1995 - Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biology and Biochemistry*. **27**, 341-348.

Borneman, J. and E. W. Triplett, 1997a - Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 2647-2653.

Borneman, J. and E. W. Triplett, 1997b - Rapid and direct method for extraction of RNA from soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**, 1621-1624.

Bossuyt, H., J. Six and P. F. Hendrix, 2005 - Protection of soil carbon by microaggregates within earthworm casts. *Soil Biology and Biochemistry*. **37**, 251-258.

Bouché, M. B., 1977 - Stratégies lombriciennes. *Bull. Ecol.* **25**, 122-132.

Bouché, M. B. and R. Aliaga, 1986 - Contre une dégradation physique et chimique des sols et pour leur optimisation économique, l'échantillonnage des lombriciens: une urgente nécessité. *La Défense des végétaux*. **242**, 30-36.

Bougon, N., 2007 - L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe, Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.

Boundy-Mills, K. L., M. L. de Souza, R. T. Mandelbaum, L. P. Wackett and M. J. Sadowsky, 1997 - The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 916-923.

Braker, G., H. L. Ayala-del-Rio, A. H. Devol, A. Fesefeldt and J. M. Tiedje, 2001 - Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific northwest marine sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1893-1901.

Brown, G. G., I. Barois and P. Lavelle, 2000 - Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *European Journal of Soil Biology*. **36**, 177-198.

- Bundt, M., F. Widmer, M. Pesaro, J. Zeyer and P. Blaser, 2001** - Preferential flow paths: biological 'hot spots' in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**, 729-738.
- Buol, S., 1995** - Sustainability of soil use. *Annual review of ecology and systematics*. **26**, 25-44.
- Burgmann, H., F. Widmer, W. V. Sigler and J. Zeyer, 2003** - mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 1928-1935.
- Cai, B., Y. Han, B. Liu, Y. Ren and S. Jiang, 2003** - Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology*. **36**, 272-276.
- Calvet, R., E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M.-P. Charnay and Y. Coquet, 2005** - Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales, Paris.
- Carrasco, J. M. and C. Sabater, 1997** - Toxicity of atrazine and chlorosulfuron to algae. *Toxicology and Environmental Chemistry*. **59**, 89-99.
- Cheney, M. A., J. Y. Shin, D. E. Crowley, S. Alvey, N. Malengreau and G. Sposito, 1998** - Atrazine dealkylation on a manganese oxide surface. *Colloid surface*. **137**, 267-273.
- Chirnside, A. E. M., W. F. Ritter and M. Radosevich, 2007** - Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site soil capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biology and Biochemistry*. **39**, 3056-3065.
- Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord and C. L. Kitts, 1998** - Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*. **31**, 135-142.
- Cole, L., M. A. Bradford, P. J. A. Shaw and R. D. Bardgett, 2006** - The abundance, richness and functional role of soil meso- and macrofauna in temperate grassland-A case study. *Applied Soil Ecology*. **33**, 186-198.
- Coleman, D. C. and W. B. Whitman, 2005** - Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia*. **49**, 479-497.
- Coleman, J., M. Blake-Kalff and E. Davies, 1997** - Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*. **2**, 144-151.
- Cook, A. M. and R. Huetter, 1984** - Deethylsimazine: bacterial dechlorination, deamination, and complete degradation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **32**, 581-585.
- Courtois, S., C. M. Cappellano, M. Ball, F.-X. Francou, P. Normand, G. Helynck, A. Martinez, S. J. Kolvek, J. Hopke, M. S. Osburne, P. R. August, R. Nalin, M. Guérineau, P. Jeannin, P. Simonet and J.-L. Pernodet, 2003** - Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 49-55.
- Courty, P. E., M. Poletto, F. Duchaussoy, M. Buée, J. Garbaye and M. F., soumis** - Gene transcription of *Lactarius quietus* - *Quercus petraea* ectomycorrhizas from a forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Cunliffe, M. and M. A. Kertesz, 2006** - Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in aged and freshly PAH-contaminated soils. *Environmental Pollution*. **144**, 228-237.
- Cupples, A. M. and G. K. Sims, 2007** - Identification of *in situ* 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil microorganisms using DNA-stable isotope probing. *Soil Biology and Biochemistry*. **39**, 232-238.

- Curry, J. P. and O. Schmidt, 2007** - The feeding ecology of earthworms - A review. *Pedobiologia*. **50**, 463-477.
- Daane, L. L., J. A. Molina, E. C. Berry and M. J. Sadowsky, 1996** - Influence of earthworm activity on gene transfer from *Pseudomonas fluorescens* to indigenous soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 515-521.
- Daniel, O. and J. M. Anderson, 1992** - Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passage through the gut of the earthworm *Lumbricus rubellus* hoffmeister. *Soil Biology and Biochemistry*. **24**, 465-470.
- Darwin, C., 1881** - On the formation of vegetable mounds through the action of worms with observations on their habits Murray, London.
- de Ruiter, P. C., B. Griffiths and J. C. Moore, 2002** - Biodiversity and stability in soil ecosystems: patterns, processes and the effects of disturbance. In: S. N. M. Loreau, P. Inchausti (Ed.), *Biodiversity and ecosystem functioning, synthesis and perspectives*, Oxford University Press, New York, pp. 102-113.
- de Souza, M. L., L. P. Wackett, K. L. Boundy-Mills, R. T. Mandelbaum and M. J. Sadowsky, 1995** - Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 3373-3378.
- de Souza, M. L., M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 1996** - Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *Journal of Bacteriology*. **178**, 4894-4900.
- de Souza, M. L., D. Newcombe, S. Alvey, D. E. Crowley, A. Hay, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 1998a** - Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 178-184.
- de Souza, M. L., J. Seffernick, B. Martinez, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 1998b** - The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*. **180**, 1951-1954.
- de Souza, M. L., L. P. Wackett and M. J. Sadowsky, 1998c** - The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 2323-2326.
- Decaens, T., J. J. Jimenez, C. Gioia, G. J. Measey and P. Lavelle, 2006** - The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology*. **42**, S23-S38.
- Devers, M., G. Soulas and F. Martin-Laurent, 2004** - Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods*. **56**, 3-15.
- Devers, M., S. Henry, A. Hartmann and F. Martin-Laurent, 2005** - Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (*atz*) from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize-cultivated soil. *Pest Management Science*. **61**, 870-880.
- Devers, M., N. Rouard and F. Martin-Laurent, 2008** - Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology*. **10**, 676-684.
- Dobrindt, U. and J. Hacker, 2001** - Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **4**, 550-557.
- Drake, H. L. and M. A. Horn, 2007** - As the worm turns: the earthworm gut as a transient habitat for soil microbial biomes. *Annual review of microbiology*. **61**, 169-189.
- Duarte, G. F., A. S. Rosado, L. Seldin, A. C. Keijzer-Wolters and J. D. van Elsas, 1998** - Extraction of ribosomal RNA and genomic DNA from soil for studying the diversity of the indigenous bacterial community. *Journal of Microbiological Methods*. **32**, 21-29.

- Dumont, M. G. and J. C. Murrell, 2005** - Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature*. **3**, 499.
- Dumont, M. G., S. M. Radajewski, C. B. Miguez, I. R. McDonald and J. C. Murrell, 2006** - Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environmental Microbiology*. **8**, 1240-1250.
- Dunbar, J., L. O. Ticknor and C. R. Kuske, 2000** - Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 2943-2950.
- Dupre, J. and M. A. O'Malley, 2007** - Metagenomics and biological ontology. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. **38**, 834-846.
- Eaton, R. W. and J. S. Karns, 1991a** - Cloning and comparison of the DNA encoding ammelide aminohydrolase and cyanuric acid amidohydrolase from three s-triazine-degrading bacterial strains. *Journal of Bacteriology*. **173**, 1363-1366.
- Eaton, R. W. and J. S. Karns, 1991b** - Cloning and analysis of s-triazine catabolic genes from *Pseudomonas* sp. strain NRRLB-12227. *Journal of Bacteriology*. **173**, 1215-1222.
- Edwards, W. M., M. J. Shipitalo, L. B. Owens and W. A. Dick, 1993** - Factors affecting preferential flow of water and atrazine through earthworm burrows under continuous no-till corn. *Journal of environmental quality*. **22**, 453-457.
- Egert, M., S. Marhan, B. Wagner, S. Scheu and M. W. Friedrich, 2004** - Molecular profiling of 16S rRNA genes reveals diet-related differences of microbial communities in soil, gut, and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Oligochaeta: Lumbricidae). *FEMS Microbiology Ecology*. **48**, 187-197.
- Esser, H. O., G. Dupuis, E. Ebert, G. J. Marco and C. Vogel, 1975** - Herbicides, Marcel Dekker, New York.
- Ettema, C. H. and D. A. Wardle, 2002** - Spatial soil ecology. *Trends in Ecology & Evolution*. **17**, 177-183.
- Fang, C., M. Radosevich and J. J. Fuhrmann, 2001** - Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**, 671-678.
- Farenhorst, A., E. Topp, B. T. Bowman and A. D. Tomlin, 2000a** - Earthworm burrowing and feeding activity and the potential for atrazine transport by preferential flow. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**, 479-488.
- Farenhorst, A., E. Topp, B. T. Bowman and A. D. Tomlin, 2000b** - Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**, 23-33.
- Fedke, C., 1982** - Biochemistry and physiology of herbicide action. In: Springer-Verlag (Ed.), Berlin, pp. 35-43.
- Felske, A., B. Engelen, U. Nubel and H. Backhaus, 1996** - Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 4162-4167.
- Fierer, N., M. Breitbart, J. Nulton, P. Salamon, C. Lozupone, R. Jones, M. Robeson, R. A. Edwards, B. Felts, S. Rayhawk, R. Knight, F. Rohwer and R. B. Jackson, 2007** - Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**, 7059-7066.
- Fischer, K., D. Hahn, W. Honerlage and J. Zeyer, 1997** - Effect of passage through the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. on *Bacillus megaterium* studied by whole cell hybridization. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**, 1149-1152.

Franklin, R. B. and A. L. Mills, 2003 - Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microbiology Ecology*. **44**, 335-346.

Furlong, M. A., D. R. Singleton, D. C. Coleman and W. B. Whitman, 2002 - Molecular and culture-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and the burrows and casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 1265-1279.

Garcia-Gonzalez, V., F. Govantes, O. Porrua and E. Santero, 2005 - Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *Journal of Bacteriology*. **187**, 155-167.

Gelsomino, A., A. C. Keijzer-Wolters, G. Cacco and J. D. van Elsas, 1999 - Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. **38**, 1-15.

Gevao, B., K. T. Semple and K. C. Jones, 2000 - Bound pesticide residues in soil: a review. *Environmental Pollution*. **108**, 3-14.

Gevao, B., C. Mordaunt, K. T. Semple, T. G. Pearce and K. C. Jones, 2001 - Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environmental Science and Technology*. **35**, 501-507.

Ghosh, D., K. Roy, K. E. Williamson, D. C. White, K. E. Wommack, K. L. Sublette and M. Radosevich, 2008 - Prevalence of lysogeny among soil bacteria and presence of 16S rRNA and *trzN* genes in viral-community DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**, 495-502.

Giardina, M. C., M. T. Giardi and G. Filacchioni, 1982 - Atrazine metabolism by *Nocardia*: elucidation of initial pathway and synthesis of potential metabolites. *Agricultural and Biological Chemistry*. **46**, 1439-1445.

Griffiths, B. S., K. Ritz, R. D. Bardgett, R. Cook, S. Christensen, F. Ekelund, S. J. Sorensen, E. Baath, J. Bloem, P. C. de Ruiter, J. Dolfing and B. Nicolardot, 2000 - Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos*. **90**, 279-294.

Griffiths, B. S., K. Ritz, R. Wheatley, H. L. Kuan, B. Boag, S. Christensen, F. Ekelund, S. J. Sorensen, S. Muller and J. Bloem, 2001 - An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. **33**, 1713-1722.

Grundmann, S., R. Fu, M. Schmid, M. Laschinger, B. Ruth, R. Schulin, J. C. Munch and R. Schroll, 2007 - Application of microbial hot spots enhances pesticide degradation in soils. *Chemosphere*. **68**, 511-517.

Gürtler, V. and V. A. Stanisich, 1996 - New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S- 23S rDNA spacer region. *Microbiology*. **142**, 3-16.

Handelsman, J., 2004 - Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*. **68**, 669-685.

Haynes, R. J., P. M. Fraser, J. E. Piercy and R. J. Tregurtha, 2003 - Casts of *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) and *Lumbricus rubellus* (Hoffmeister) differ in microbial activity, nutrient availability and aggregate stability: The 7th international symposium on earthworm ecology, Cardiff, Wales, 2002. *Pedobiologia*. **47**, 882-887.

Heijnen, C. E. and J. C. Y. Marinissen, 1995 - Survival of bacteria introduced into soil by means of transport by *Lumbricus rubellus*. *Biology and Fertility of Soils*. **20**, 63-69.

Hiltner, L., 1904 - Arbeiten der Deutschen landwirtschaftsgesellschaft, Vol. 98, Berlin, pp. 59-78.

Hooper, D. U., F. S. Chapin III, J. J. Ewel, A. Hector, P. Inchausti, S. Lavorel, J. H. Lawton, D. M. Lodge, M. Loreau, S. Naeem, B. Schmid, H. Setälä, A. J. Symstad, J. Vandermeer and D. A. Wardle, 2005 - Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*. **75**, 3–35.

Horn, M. A., A. Schramm and H. L. Drake, 2003 - The earthworm gut: an ideal habitat for ingested N₂O-producing microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 1662-1669.

Hunt, H. W. and D. H. Wall, 2002 - Modelling the effects of loss of soil biodiversity on ecosystem function. *Global Change Biology*. **8**, 33-50.

Hurt, R. A., X. Qiu, L. Wu, Y. Roh, A. V. Palumbo, J. M. Tiedje and J. Zhou, 2001 - Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 4495-4503.

Ihssen, J., M. A. Horn, C. Matthies, A. Gossner, A. Schramm and H. L. Drake, 2003 - N₂O-producing microorganisms in the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* are indicative of ingested soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 1655-1661.

Ingwersen, J., C. Poll, T. Streck and E. Kandeler, 2007 - Dynamics of litter carbon turnover in a detritusphere - Model-based evaluation of a ¹³C microcosm experiment, European Geosciences Union, Vol. 9, Geophysical Research Abstracts, Vienne, Austria.

Janssen, D. B., I. J. T. Dinkla, G. J. Poelarends and P. Terpstra, 2005 - Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental Microbiology*. **7**, 1868-1882.

Jegou, D., S. Schrader, H. Diestel and D. Cluzeau, 2001 - Morphological, physical and biochemical characteristics of burrow walls formed by earthworms. *Applied Soil Ecology*. **17**, 165-174.

Jenkinson, D. S. and D. S. Powlson, 1976 - The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biology and Biochemistry*. **8**, 167-177.

Joergensen, R. G., 2000 - Ergosterol and microbial biomass in the rhizosphere of grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**, 647-652.

Johnson, D., P. J. Vandenkoornhuyse, J. R. Leake, L. Gilbert, R. E. Booth, J. P. Grime, J. P. W. Young and D. J. Read, 2004 - Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist*. **161**, 503-515.

Jones, C., G., J. Lawton, H. and M. Shachak, 1994 - Organisms as Ecosystem Engineers *Oikos*. **69**, 373-386.

Jones, C., G., J. Lawton, H. and M. Shachak, 1997 - Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*. **78**, 1946.

Kelly, J. J., 2003 - Molecular techniques for the analysis of soil microbial processes: functional gene analysis and the utility of DNA microarrays. *Soil Science*. **168**, 597-605.

Kersante, A., 2003 - Rôle régulateur de la macrofaune lombricienne dans la dynamique de l'herbicide atrazine en sol cultivé tempéré, Thèse de doctorat, Université de Rennes 1.

Kersante, A., F. Martin-Laurent, G. Soulas and F. Binet, 2006 - Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology*. **57**, 192-205.

Khomiyakov, N., S. Kharin, T. Nechitailo, P. Golyshin, A. Kurakov, B. Byzov and D. Zvyagintsev, 2007 - Reaction of microorganisms to the digestive fluid of earthworms. *Microbiology*. **76**, 45-54.

Killham, K., 1994 - Soil Ecology, Cambridge University Press, Cambridge.

Kirk, J. L., L. A. Beaudette, M. Hart, P. Moutoglis, J. N. Klironomos, H. Lee and J. T. Trevors, 2004 - Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. **58**, 169-188.

Knight, J., 2003 - Accusations of bias prompt NIH review of ethical guidelines. *Nature*. **426**, 741.

Kolic, N. U., D. Hrsak, A. Begonja Kolar, I. Petric, S. Stipicevic, G. Soulas and F. Martin-Laurent, 2007 - Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **60**, 299-307.

Kretzschmar, A., 1982 - description des galeries de vers de terre et variations saisonnières des réseaux (observations en conditions naturelles). *Revue d'Ecologie et Biologie du Sol*. **19**, 579-591.

Kreuger, J. and H. Kylin, 2006 - Atmospheric transport and deposition of pesticides in Sweden. In: w. a. a. Pesticide behaviour in soils (Ed.), University of Warwick, UK.

Kuzyakov, Y. and R. Bol, 2006 - Sources and mechanisms of priming effect induced in two grassland soils amended with slurry and sugar. *Soil Biology and Biochemistry*. **38**, 747-758.

Lavelle, P., 1981 - Stratégies de reproduction chez les vers de terre. *Acta Oecologia, Oecologia generalis*. **2**, 117-133.

Lavelle, P., 1988 - Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils*. **6**, 237-251.

Lavelle, P., C. Lattaud, D. Trigo and I. Barois, 1995 - Mutualism and biodiversity in soils. *Plant and Soil*. **170**, 23-33.

Lavelle, P. and A. V. Spain, 2001 - Soil Ecology, Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands.

Lavelle, P., 2002 - Functional domains in soils. *Ecological Research*. **17**, 441-450.

Lavelle, P., C. Rouland, M. Diouf, F. Binet and A. Kersante, 2005 - Regulation of microbial activities in functional domains of roots and invertebrates. In: F. Buscot and A. Varma (Eds.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*, Vol. 3, Springer-verlag, Berlin, pp. 291-305.

Lavelle, P., T. Decaens, M. Aubert, S. Barot, M. Blouin, F. Bureau, P. Margerie, P. Mora and J. P. Rossi, 2006 - Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*. **42**, S3-S15.

Le Bayon, R. C., S. Moreau, C. Gascuel-Oudoux and F. Binet, 2002 - Annual variations in earthworm surface-casting activity and soil transport by water runoff under a temperate maize agroecosystem. *Geoderma*. **106**, 121-135.

Le Bayon, R. C. and F. Binet, 2006 - Earthworms change the distribution and availability of phosphorous in organic substrates. *Soil Biology and Biochemistry*. **38**, 235-246.

Le Bissonnais, Y., 1996 - Soil characteristics and aggregate stability. In: M. Agassi (Ed.), *soil erosion, conservation and rehabilitation*, Marcel Dekker, New York, pp. 41-76.

Lee, K. E., 1985 - Earthworms: their ecology and relationship with soils and land use, Academic Press, Sidney.

Leininger, S., T. Urich, M. Schlöter, L. Schwark, J. Qi, G. W. Nicol, J. I. Prosser, S. C. Schuster and C. Schleper, 2006 - Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*. **442**, 806-809.

Li, G. and G. T. Felbeck, 1972 - Atrazine hydrolysis as catalyzed by humic acids. *Soil Science*. **114**, 201-209.

Lipthay, J. R., T. Barkay and S. J. Sorensen, 2001 - Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiology Ecology*. **35**, 75-84.

Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng and L. J. Forney, 1997 - Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**, 4516-4522.

Loreau, M., 1998 - Biodiversity and ecosystem functioning: A mechanistic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**, 5632-5636.

Losos, J. B., 1996 - Phylogenetic perspectives on community ecology. *Ecology*. **77**, 1344-1354.

Lueders, T., B. Wagner, P. Claus and M. W. Friedrich, 2004 - Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*. **6**, 60-72.

Luepromchai, E., A. C. Singer, C.-H. Yang and D. E. Crowley, 2002 - Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. **41**, 191-197.

Lukow, T., P. F. Dunfield and W. Liesack, 2000 - Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*. **32**, 241-247.

Lynch, J. M., A. Benedetti, H. Insam, M. P. Nuti, K. Smalla, V. Torsvik and P. Nannipieri, 2004 - Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. **40**, 363-385.

Macleod, C. J. A. and K. T. Semple, 2006 - The influence of single and multiple applications of pyrene on the evolution of pyrene catabolism in soil. *Environmental Pollution*. **139**, 455-460.

Maidak, B. L., J. R. Cole, C. T. Parker, G. M. Garrity, N. Larsen, B. Li, T. G. Lilburn, M. J. McCaughey, G. J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T. M. Schmidt, J. M. Tiedje and C. R. Woese, 1999 - A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic acids research*. **27**, 171-173.

Mandelbaum, R. T., L. P. Wackett and D. L. Allan, 1993 - Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 1695-1701.

Mandelbaum, R. T., D. L. Allan and L. P. Wackett, 1995 - Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 1451-1457.

Manefield, M., A. S. Whiteley, R. I. Griffiths and M. J. Bailey, 2002 - RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 5367-5373.

Marashi, A. R. A. and J. Scullion, 2003 - Earthworm casts form stable aggregates in physically degraded soils. *Biology and Fertility of Soils*. **37**, 375-380.

Martin-Laurent, F., L. Philippot, S. Hallet, R. Chaussod, J. C. Germon, G. Soulas and G. Catroux, 2001 - DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 2354-2359.

Martin-Laurent, F., L. Cornet, L. Ranjard, J.-C. Lopez-Gutierrez, L. Philippot, C. Schwartz, R. Chaussod, G. Catroux and G. Soulas, 2004 - Estimation of atrazine-degrading genetic potential and activity in three French agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **48**, 425-435.

- Martinez, B., J. Tomkins, L. P. Wackett, R. Wing and M. J. Sadowsky, 2001** - Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*. **183**, 5684-5697.
- Masaphy, S., D. Levanon and Y. Henis, 1996** - Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation. *Bioresource Technology*. **56**, 207-214.
- Matthies, C., A. Grieshammer, M. Schmittroth and H. L. Drake, 1999** - Evidence for involvement of gut-associated denitrifying bacteria in emission of nitrous oxide (N₂O) by earthworms obtained from garden and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 3599-3604.
- Meharg, A. A., 1996** - Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.). *Soil Biology and Biochemistry*. **28**, 555-559.
- Meselson, M. and F. W. Stahl, 1958** - The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **44**, 671-682.
- Meysman, F. J. R., J. J. Middelburg and C. H. R. Heip, 2006** - Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology and Evolution*. **21**, 688-695.
- Mikola, J., R. D. Bardgett and K. Hedlund, 2002** - Biodiversity, ecosystem functioning and soil decomposer food web. In: S. N. M. Loreau, P. Inchausti (Ed.), *Biodiversity and ecosystem functioning, synthesis and perspectives*, Oxford University Press, New York, pp. 169-180.
- Miquel, G., 2003** - Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques Vol. Rapport 215, tome 2 (2002-2003).
- Mirsal, I. A., 2004** - Soil pollution. Origin, monitoring and remediation, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Mongodin, E. F., N. Shapir, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, J. B. Emerson, A. Shvartzbeyn, D. Radune, J. Vamathevan, F. Riggs, V. Grinberg, H. Khouri, L. P. Wackett, K. E. Nelson and M. J. Sadowsky, 2006** - Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1. *PLoS Genetics*. **2**, e214.
- Moore, J. C. and P. C. de Ruiter, 2000** - Invertebrates in detrital food webs along gradients of productivity. In: D. C. Coleman and P. F. Hendrix (Eds.), *Invertebrates as web-masters in ecosystems*, CABI Publishing, Wallingford, U.K., pp. 161-184.
- Moran, M. A., V. L. Torsvik, T. Torsvik and R. E. Hodson, 1993** - Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 915-918.
- Morris, S. A., S. Radajewski, T. W. Willison and J. C. Murrell, 2002** - Identification of the functionally active methanotroph population in a peat soil microcosm by stable-isotope probing. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 1446-1453.
- Mou, X., S. Sun, R. A. Edwards, R. E. Hodson and M. A. Moran, 2008** - Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean. *Nature*. **451**, 708-711.
- Mulbry, W. W., 1994** - Purification and characterization of an inducible s-triazine hydrolase from *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, 613-618.
- Mulbry, W. W., H. Zhu, S. M. Nour and E. Topp, 2002** - The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: Cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*. **206**, 75-79.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich, 1986** - Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **51**, 263-273.

Muyzer, G., E. C. de Waal and A. G. Uitterlinden, 1993 - Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 695-700.

Muyzer, G. and K. Smalla, 1998 - Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. **73**, 127-141.

Nagy, I., F. Compennolle, K. Ghys, J. Vanderleyden and R. De Mot, 1995a - A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 2056-2060.

Nagy, I., G. Schoof, F. Compennolle, P. Proost, J. vanderleyden and R. De Mot, 1995b - Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducing cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*. **177**, 676-687.

Nannipieri, P., J. Ascher, M. T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara and G. Renella, 2003 - Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*. **54**, 655-670.

Neufeld, J., D., G. D. Marc, V. Jyotsna and J. C. Murrell, 2006 - Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*. **53**, 435-442.

Newcombe, D. A. and D. E. Crowley, 1999 - Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**, 877-882.

Nicolaisen, M. H., J. Baelum, C. S. Jacobsen and J. Sorensen, 2008 - Transcription dynamics of the functional *tfdA* gene during MCPA herbicide degradation by *Cupriavidus necator* AEO106 (pRO101) in agricultural soil. *Environmental Microbiology*. **10**, 571-579.

Osborn, A. M., E. R. B. Moore and K. N. Timmis, 2000 - An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*. **2**, 39-50.

Ostrofsky, E. B., J. B. Robinson, S. J. Traina and O. H. Tuovinen, 2002 - Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. *Soil Biology and Biochemistry*. **34**, 1449-1459.

Park, J.-H., Y. Feng, P. Ji, T. C. Voice and S. A. Boyd, 2003 - Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 3288-3298.

Parkin, T. B. and E. C. Berry, 1999 - Microbial nitrogen transformations in earthworm burrows. *Soil Biology and Biochemistry*. **31**, 1765-1771.

Parle, 1963 - A microbiological study of earthworm casts. *Journal of genetic and microbiology*, 13-22.

Pedersen, J. C. and N. B. Hendriksen, 1993 - Effect of passage through the intestinal tract of detritivore earthworms (*Lumbricus* spp.) on the number of selected Gram-negative and total bacteria. *Biology and Fertility of Soils*. **16**, 227-232.

Pelizzetti, E., V. Maurino, C. Minero, V. Carlin, M. L. Tosato, E. Pramauro and O. Zerbini, 1990 - Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides. *Environmental Science and Technology*. **24**, 1559-1565.

Posada, D. and K. A. Crandall, 1998 - MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*. **14**, 817-818.

- Postma, J. and J. A. van Veen, 1990** - Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* introduced into soil. *Microbial Ecology*. **19**, 149-161.
- Prosser, J. I., 2002** - Molecular and functional diversity in soil micro-organisms. *Plant and Soil*. **244**, 9-17.
- Quinn, G. P. and M. J. Keough, 2002** - Experimental design and data analysis for biologists, Cambridge University Press.
- Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh and J. C. Murrell, 2000** - Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*. **403**, 646-649.
- Radajewski, S., I. R. McDonald and J. C. Murrell, 2003** - Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**, 296-302.
- Radosevich, M., S. J. Traina, Y. L. Hao and O. H. Tuovinen, 1995** - Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 297-302.
- Radosevich, M., S. J. Traina and O. H. Tuovinen, 1996** - Biodegradation of atrazine in surface soils and subsurface sediments collected from an agricultural research farm. *Biodegradation*. **7**, 137-149.
- Ranjard, L., E. Brothier and S. Nazaret, 2000** - Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 5334-5339.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R. M. Goodman, 2000** - Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 2541-2547.
- Rossello-Mora, R. and R. Amann, 2001** - The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. **25**, 39-67.
- Rousseaux, S., A. Hartmann and G. Soulas, 2001** - Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **36**, 211-222.
- Rousseaux, S., G. Soulas and A. Hartmann, 2002** - Plasmid localisation of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. *FEMS Microbiology Ecology*. **41**, 69-75.
- Rousseaux, S., A. Hartmann, B. Lagacherie, S. Piutti, F. Andreux and G. Soulas, 2003** - Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere*. **51**, 569-576.
- Sadowsky, M. J., Z. Tong, M. de Souza and L. P. Wackett, 1998** - AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *Journal of Bacteriology*. **180**, 152-158.
- Saleh-Lakha, S., M. Miller, R. G. Campbell, K. Schneider, P. Elahimanesh, M. M. Hart and J. T. Trevors, 2005** - Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *Journal of Microbiological Methods*. **63**, 1-19.
- Schonholzer, F., D. Hahn, B. Zarda and J. Zeyer, 2002** - Automated image analysis and *in situ* hybridization as tools to study bacterial populations in food resources, gut and cast of *Lumbricus terrestris* L. *Journal of Microbiological Methods*. **48**, 53-68.
- Schwartz, M. W., C. A. Brigham, J. D. Hoeksema, K. G. Lyons, M. H. Mills and P. J. van Mantgem, 2000** - Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia*. **122**, 297-305.

Seffernick, J. L., M. L. de Souza, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 2001 - Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98 percent identical but functionally different. *Journal of Bacteriology*. **183**, 2405-2410.

Seffernick, J. L. and L. P. Wackett, 2001 - Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry*. **40**, 12747-12753.

Seffernick, J. L., A. Aleem, J. P. Osborne, G. Johnson, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 2007 - Hydroxyatrazine N-ethylaminohydrolase (AtzB): an amidohydrolase superfamily enzyme catalyzing deamination and dechlorination. *Journal of Bacteriology*. **189**, 6989-6997.

Selosse, M.-A., E. Baudoin and P. Vandenkoornhuysen, 2004 - Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*. **327**, 639-648.

Sextone, A. J., N. P. Revsbech, T. B. Parkin and J. M. Tiedje, 1985 - Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates. *Soil science society of America journal*. **49**, 645-651.

Shao, Z. Q. and R. Behki, 1995 - Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus* sp. strain TE1. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**, 2061-2065.

Shao, Z. Q., W. Seffens, W. Mulbry and R. M. Behki, 1995 - Cloning and expression of the s-triazine hydrolase gene (*trzA*) from *Rhodococcus corallinus* and development of *Rhodococcus* recombinant strains capable of dealkylating and dechlorinating the herbicide atrazine. *Journal of Bacteriology*. **177**, 5748-5755.

Shao, Z. Q. and R. Behki, 1996 - Characterization of the expression of the *thcB* gene, coding for a pesticide-degrading cytochrome P-450 in *Rhodococcus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**, 403-407.

Shapir, N., J. P. Osborne, G. Johnson, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 2002 - Purification, substrate range, and metal center of AtzC: the N-isopropylammelide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism. *Journal of Bacteriology*. **184**, 5376-5384.

Shapir, N., C. Rosendahl, G. Johnson, M. Andreina, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 2005 - Substrate specificity and colorimetric assay for recombinant TrzN derived from *Arthrobacter aurescens* TC1. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 2214-2220.

Shapir, N., E. F. Mongodin, M. J. Sadowsky, S. C. Daugherty, K. E. Nelson and L. P. Wackett, 2007 - Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *Journal of Bacteriology*. **189**, 674-682.

Sharma, S., V. Radl, B. Hai, K. Kloos, M. Mrkonjic Fuka, M. Engel, K. Schauss and M. Schloter, 2007 - Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods*. **68**, 445-452.

Sigua, G. C., A. R. Isensee, A. M. Sadeghi and G. J. Im, 1995 - Distribution and transport of atrazine as influenced by surface cultivation, earthworm population and rainfall pattern. *Chemosphere*. **31**, 4237-4242.

Silva, E., A. M. Fialho, I. Sa-Correia, R. G. Burns and L. J. Shaw, 2004 - Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. *Environmental Science and Technology*. **38**, 632-637.

Singer, A. C., D. E. Crowley and I. P. Thompson, 2003 - Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*. **21**, 123-130.

Singer, A. C., C. J. van der Gast and I. P. Thompson, 2005 - Perspectives and vision for strain selection in bioaugmentation. *Trends in Biotechnology*. **23**, 74-77.

Singh, B. K., A. Walker and D. J. Wright, 2005 - Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds. *Soil Biology and Biochemistry*. **37**, 1675-1682.

Singleton, D. R., P. F. Hendrix, D. C. Coleman and W. B. Whitman, 2003 - Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry*. **35**, 1547-1555.

Singleton, D. R., S. N. Powell, R. Sangaiah, A. Gold, L. M. Ball and M. D. Aitken, 2005 - Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**, 1202-1209.

Skipper, H. D., G. C. M. and W. R. Furtick, 1967 - Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. *Soil Science Society of America Proceedings*. **31**, 653-656.

Smith, D., S. Alvey and D. E. Crowley, 2005 - Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*. **53**, 265-275.

Smith, D. and D. E. Crowley, 2006 - Contribution of ethylamine degrading bacteria to atrazine degradation in soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **58**, 271-277.

Spain, J. C., P. H. Pritchard and A. W. Bourquin, 1980 - Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **40**, 726-734.

Stenstrom, J., K. Svensson and M. Johansson, 2001 - Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology*. **36**, 93-104.

Stork, N. E. and P. Eggleton, 1992 - Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *American journal of alternative agriculture*. **7**, 38-47.

Strong, L. C., H. McTavish, M. J. Sadowsky and L. P. Wackett, 2000 - Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. *Environmental Microbiology*. **2**, 91-98.

Struthers, J. K., K. Jayachandran and T. B. Moorman, 1998 - Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**, 3368-3375.

Swift, M. J., A. M. N. Izac and M. van Noordwijk, 2004 - Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes - are we asking the right questions? *Agriculture, Ecosystems & Environment*. **104**, 113-134.

Taroncher-Oldenburg, G., E. M. Griner, C. A. Francis and B. B. Ward, 2003 - Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 1159-1171.

Thioulouse, J., D. Chessel, S. Doledec and J.-M. Olivier, 1997 - ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and Computing*. **7**, 75-83.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins, 1997 - The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*. **25**, 4876-4882.

Tiedje, J. M., S. Asuming-Brempong, K. Nusslein, T. L. Marsh and S. J. Flynn, 1999 - Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. **13**, 109-122.

Tiunov, A. V. and S. Scheu, 1999 - Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry*. **31**, 2039-2048.

Tiunov, A. V. and S. Scheu, 2000a - Microbial biomass, biovolume and respiration in *Lumbricus terrestris* L. cast material of different age. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**, 265-275.

Tiunov, A. V. and S. Scheu, 2000b - Microfungal communities in soil, litter and casts of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae): a laboratory experiment. *Applied Soil Ecology*. **14**, 17-26.

Tiunov, A. V., M. Bonkowski, M. Bonkowski, J. A. Tiunov and S. Scheu, 2001 - Microflora, Protozoa and Nematoda in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. *Pedobiologia*. **45**, 46-60.

Tiunov, A. V. and T. G. Dobrovolskaya, 2002 - Fungal and bacterial communities in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. *Pedobiologia*. **46**, 595-605.

Tomlin, A. D., M. J. Shipitalo, W. M. Edwards and R. Protz, 1995 - Earthworms and their influence on soil structure and infiltration. In: P. F. Hendrix (Ed.), *Earthworm ecology and biogeography in North America*, Boca Raton, FL, Lewis Publ., pp. 159-183.

Top, E. M. and D. Springael, 2003 - The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**, 262-269.

Topp, E., W. M. Mulbry, H. Zhu, S. M. Nour and D. Cuppels, 2000a - Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 3134-3141.

Topp, E., H. Zhu, S. M. Nour, S. Houot, M. Lewis and D. Cuppels, 2000b - Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**, 2773-2782.

Torsvik, V., F. L. Daae, R.-A. Sandaa, Oslash and L. vreas, 1998 - Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology*. **64**, 53-62.

Torsvik, V. and L. Ovreas, 2002 - Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. **5**, 240-245.

Tsai, Y. L. and B. H. Olson, 1991 - Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**, 1070-1074.

Urlacher, V. B., S. Lutz-Wahl and R. D. Schmid, 2004 - Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **V64**, 317-325.

Vaishampayan, P. A., P. P. Kanekar and P. K. Dhakephalkar, 2007 - Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **60**, 273-278.

van der Meer, J. R., W. M. de Vos, S. Harayama and A. J. B. Zehnder, 1992 - Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological reviews*. **56**, 677-694.

Van der Perk, M., 2006 - Soil and water contamination, Taylor & Francis group plc, London, UK.

Vance, E. D., P. C. Brookes and D. S. Jenkinson, 1987 - An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*. **19**, 703-707.

Vandenkoornhuyse, P., R. Husband, T. J. Daniell, I. J. Watson, J. M. Duck, A. H. Fitter and J. P. W. Young, 2002 - Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Molecular Ecology*. **11**, 1555-1564.

Vandenkoornhuyse, P., K. P. Ridgway, I. J. Watson, A. H. Fitter and J. P. W. Young, 2003 - Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*. **12**, 3085-3095.

Vandenkoornhuyse, P., S. Mahe, P. Ineson, P. Staddon, N. Ostle, J.-B. Cliquet, A.-J. Francez, A. H. Fitter and J. P. W. Young, 2007 - Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**, 16970-16975.

Vannier, G., 1987 - The porosphere as an ecological medium emphasized in Professor Ghilarov's work on soil animal adaptations. *Biology and Fertility of Soils*. **3**, 39-44.

Wackett, L., M. Sadowsky, B. Martinez and N. Shapir, 2002 - Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58**, 39-45.

Wardle, D. A., R. D. Bardgett, J. N. Klironomos, H. Setälä, W. H. van der Putten and D. H. Wall, 2004 - Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*. **304**, 1629-1633.

Wellington, E. M. H., A. Berry and M. Krsek, 2003 - Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing. *Current Opinion in Microbiology*. **6**, 295-301.

Werner, D., 1992 - Symbiosis of plants and microbes, London, United Kingdom.

Wolters, V., 1997 - Functional implications of biodiversity in soil. *Office for official publications of the European Community*.

Wolters, V., 2001 - Biodiversity of soil animals and its function. *European Journal of Soil Biology*. **37**, 221-227.

Yaron, B., R. Calvet and R. Prost, 1996 - Soil pollution, Processes and dynamics, Springer-Verlag, Berlin, Germany.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Biomasse des lombriciens utilisés dans les microcosmes des différentes expérimentations et production des microsites de sol

		Biomasse totale des 3 lombriciens (g)	Production de microsite (mg/l/g de ver)		endentères (mg)		
			Paroi de galeries	Turricules	Antérieur	Médian	Postérieur
microcosmes article 2	Sol de Vezin	8.6 +/- 0.2	23.2	59.2	ND	666 +/- 280	690 +/- 272
	Sol de Vezin + <i>P. ADP</i>	8.5 +/- 0.2	46	60	ND	710 +/- 230	638 +/- 272
	Sol de Vezin + <i>C. heintzii</i>	8.5 +/- 0.2	52.8	111	ND	630 +/- 213	652 +/- 425
microcosmes article 3	Sol de Vezin	10.4 +/- 0.2	25.8	ND	382 +/- 277	196 +/- 120	200 +/- 118
	Sol de Vezin + <i>P. ADP</i>	10.4 +/- 0.1	33.8	ND	224 +/- 94	147 +/- 93	170 +/- 42
	Sol d'Epoisses	10.5 +/- 0.2	27.8	ND	268 +/- 56	400 +/- 201	400 +/- 118
	Sol d'Epoisses + <i>P. ADP</i>	10.5 +/- 0.2	37.4	ND	324 +/- 174	80 +/- 122	84 +/- 92
microcosmes article 4	Sol d'Epoisses	12 +/- 0.3	ND	47	ND	ND	ND
microcosmes article 5	Sol d'Epoisses	8.2 +/- 0.3	19.3	28.9	87 +/- 84	95 +/- 74	123 +/- 80

ANNEXE 2 : Script de la procédure ‘Maximum de parcimonie’ sous Paup 4.0 β 10:

```
outgroup nom entier de la séquence choisie (AJ347774 dans notre cas)
hsearch multrees=no addseq=random nreps=500 swap=tbr
savetrees file=nom de la matriceMP format=nexus brlens=yes
lscore all/wts=ignore nst=2 tratio=est rates=gamma
    (Fonction qui calcule les valeurs de probabilité des arbres équiprobables dans MP
    pour savoir quelle est réellement la meilleure solution, la valeur absolue la plus petite
    correspond à la meilleure valeur de vraisemblance)
hsearch multrees=no addseq=random nreps=15 swap=tbr
bootstrap nreps=1000 conlevel= 50 keepall=no brlens=yes treefile= nom de la
matriceMPBoot.tre
```

ANNEXE 3 : Script du calcul du meilleur modèle sous Paup 4.0 β 10

```

log file= modelfit.log replace
DSet distance=JC objective=ME base=equal rates=equal pinv=0
subst=all negbrlen=setzero
NJ showtree=no breakties=random
End
    (Calcul d'un arbre NJ en utilisant le modèle d'évolution JC69)
Default lscores longfmt=yes
Set criterion=like
    (Initialisation pour le test des 56 modèles d'évolution)
lscores 1/ nst=1 base=equal rates=equal pinv=0
scorefile=model.scores replace;
    (test du premier modèle, JC)
lscores 1/ nst=1 base=equal rates=equal pinv=est
scorefile=model.scores append;
    (Test du second modèle, JC+I)
...
    (test des 55 autres modèles)
lscores: tree/s
nst: number of substitution types
rmat: rate matrix
base= nucleotide frequencies
rates= rate of evolution for variable sites

```

Script de la procédure 'Maximum de vraisemblance' sous Paup 4.0 β 10:

```

outroup nom entier de la séquence choisie \(AJ347774 dans notre cas\)
hsearch multtree=no addseq=simple swap=nni
Set criterion=distance
Dset distance=gtr
Set criterion=likelihood
Lset Base (Afrequency Cfrequency Gfrequency) Nst=6 Rmat=(1* 2* 3* 4* 5*)
Rates=gamma Shape=gammashapeparameter Pinvar=proportionofinvariablesites
    (Ces valeurs sont obtenues suite au calcul du meilleur modèle par modeltest 3.7,
    l'arbre possédant la meilleure topologie est celui possédant le plus petit -lnL,
    GTR+I+G dans notre cas)
hsearch
Savetrees file=nom de la matriceMLGTRIG format=nexus brlens=yes
Bootstrap nrep=100

```


ANNEXE 4 : Script GLM sous R

```
>mynomdelamatrice<-readtable("chemin d'accès/nom du fichier.txt ", header=T)
>dataframe=mynomdelamatrice
>mynomdelamatrice$Facteur1<-factor(mynomdelamatrice$Facteur1)
>mynomdelamatrice$Facteur2<-factor(mynomdelamatrice$Facteur2)
>summary(mynomdelamatrice)
>last.glm<-glm(X~Facteur1+Facteur2+Facteur1*Facteur2, family=poisson,
data=mynomdelamatrice)
>summary(last.glm)
>anova(last.glm, test="Chisq")
```

ANNEXE 5 : Phylotypes bactériens détectés avec l'utilisation du SIP-ARN avec de l'atrazine marquée au ¹³C

Phylogenetic group	Best Blast Hit	phylotypes	Sharing phylotypes	Burrow-linings 2 days		Burrow-linings 8 days		Bulk soil		Casts		Total	
				¹² C-RNA	¹³ C-RNA	¹² C-RNA	¹³ C-RNA	¹² C-RNA	¹³ C-RNA	¹² C-RNA	¹³ C-RNA	¹² C-RNA	¹³ C-RNA
Bacteroidetes		30				12						12	
	<i>Pedobacter suwonensis</i> DQ097274	39								1			1
Firmicutes		2						7				7	
	<i>Lactobacillus iners</i> AY526083	3							5				5
	<i>Streptococcus oralis</i> AB355617	1	A				5	8	8			8	13
Actinobacteria	<i>Nocardioides</i> sp. C190 AF253510	4						15				15	
		7							3				3
		8							3				3
	<i>Aeromicrobium qinsengisoli</i> AB245395	5							10				10
		9							4				4
	<i>Rhodococcus luteus</i> X79187	10						23	16			23	16
		32				1						1	
	<i>Nocardioides fulvus</i> AY167855	31				4						4	
	<i>Micrococcus luteus</i> EU071593	6	B				4		6	3	58	3	68
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> EU256457	13							1				1
α-Proteobacteria	<i>Caulobacter vibrioides</i> AJ227755	15							1				1
		26		2								2	
	<i>Methylobacterium fujisawaense</i> AB175634	24		2								2	
		34					10						10
		41								1			1
		16	D			6	3	2				8	3
	<i>Paracoccus marcusii</i> AY881236	14	C				9		3				12
	<i>Sphingomonas rhizogenes</i> AY962684	25	J	5		19	3					24	3
	<i>Methylobacterium lusitanum</i> AB175635	33	L				2			6			8
		21							8				8
β-Proteobacteria	<i>Azohydromonas lata</i> AB201626	29		22								22	
	<i>Acidovorax delafieldii</i> AB269774	37				20						20	
		38					1						1
	<i>Curvibacter gracilis</i> AB109889	42								15		15	
	<i>Pelomonas aquatica</i> AM501435	19	F	37	45	5	29	34		5	9	81	83
	<i>Massilia timonae</i> AM237371	22	H						7	43		43	7
	<i>Ralstonia basilensis</i> M91-3 L31650	20	G				4		5		1		10
	<i>Massilia timonae</i> AY157761	23	I	11		24	1	36	6		3	71	10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EU139850	17							1				1
	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP AF326383	27	M	6		7	9					13	9
γ-Proteobacteria		36					2						2
		35					1						1
	<i>Acinetobacter lwoffii</i> DQ144736	18	E	1				1				2	
	<i>Shigella sonnei</i> AB273732	28	K	4		1	3					5	3
Deinococci		40								1			1
Gemmatimonadates		12						2				2	
Chloroflexi	unc. Chloroflexi bact. AY922044	11							4				4
Number of sequences analyzed				90	45	99	86	128	91	66	80	383	302